

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Caracterización de proteínas de *Helicobacter pylori* reconocidas por sueros de personas evaluadas por la prueba de ureasa en aliento



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Iracema del Carmen Rodríguez Hernández

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar la Tesis de Iracema del Carmen Rodríguez Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dr. Eduardo Ruiz Bustos

Director

Dra. Maria del Carmen Candia Plata

Secretario

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Vocal

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Ante todo doy gracias a Dios, por todas las bendiciones que ha puesto en mi camino: por acompañarme y ser la esencia que me da fuerza y esperanza día con día.

A la Universidad de Sonora, por ofrecer el Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud, y a todas las autoridades que en su momento me brindaron los apoyos necesarios para poder cursar este programa.

Al Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por facilitar sus instalaciones. Al Dr. Carlos Velázquez y a la Dra. Carmen Candia, por todos los materiales y reactivos, con los que contribuyeron en lo posible para la realización de este trabajo. Así como a la Dra. Silvia Moya y al Dr. Humberto Astiazarán del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por su colaboración en el proyecto.

A mis sinodales, Dra. María del Carmen Candia Plata, Dr. Carlos Velázquez Contreras, Dr. Ramón Robles Zepeda y Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por compartir su experiencia académica y contribuir en el mejoramiento de este trabajo.

Especialmente al Dr. Ruiz Bustos, por su asesoría, dedicación y paciencia, por comprenderme y ayudarme en todo momento; porque a pesar de todo el tiempo transcurrido y mis ocurrencias, siempre me animó y nunca me perdió la confianza, muchas Gracias!

Indiscutiblemente a la M.C. Lucila Rascón Durán, por su gran empeño en el trabajo, su invaluable experiencia y el apoyo técnico aportado para la realización de este trabajo. Por ubicarme cada que me perdía, por enseñarme que a pesar de cualquier resultado siempre hay opciones, y que debemos estar alertas para saber aprovecharlas. Todo esto, sus ánimos, su amistad y su cariño fueron de gran ayuda. Muchas GRACIAS!

A todos mis compañeros y amigos de Laboratorio's (incluyendo a los becados: Jael) gracias por compartir sus experiencias y por todas las palabras de aliento.

A quienes fueron mis compañeros de generación, hoy grandes amigos; Alma, Alejandra, Aimara, Ana Gloria, Pacheco y Vélez, aprendí mucho con ustedes y me permitieron disfrutar hasta de las materias y horarios más difíciles.

A quienes iniciaron siendo mis compañeros de trabajo del 5N-QB, y terminaron siendo mi familia; especialmente Anita, Miriam, a las maestras Blanquita, Tere, Rosita, Olga. Muchísimas gracias por apoyarme tanto, por preocuparse por mí, porque siempre tuvieron las palabras necesarias para impulsarme a seguir adelante, fue muy grato trabajar con ustedes!!

A toda mi familia, especialmente a mis padres, por todo su cariño, por enseñarme que *lo importante de tener éxito está en poder disfrutar lo que estas realizando*. A mis suegros, quienes durante esta etapa no solo se convirtieron en mi familia, sino también en grandes amigos, gracias por cuidar a mi termita por horas y más horas. Sin su apoyo y dedicación no hubiese sido posible, GRACIAS.

Finalmente quiero agradecer de forma especial a dos Alexeles que fueron pieza clave en esta etapa; a quien se unió a mi vida Alexel JBE, por acompañarme y compartir todos estos sueños juntos y a mi pequeño Alexito, por llegar a mi vida y despertar sentimientos que nunca hubiera imaginado que existen. Realmente no me alcanzan las palabras para agradecerles y decirles cuanto los amo!

DEDICATORIAS

Con todo mi amor dedico el esfuerzo de este trabajo a mi familia; por ser la inspiración de mi vida. A Alexel por mostrar el coraje necesario ante cualquier adversidad, por compartir la dicha de ser padres y por todo el amor que me ha demostrado durante este tiempo. A mi Hijo Alexel y a ese angelito que viene en camino, por permitirme sentir el amor más profundo e incondicional. Son mi fortaleza y los regalos más grande que he tenido en la vida!

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS.....	x
General	x
Particulares	x
RESÚMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	4
Características Generales de <i>H. pylori</i>	4
Proteínas de <i>H. pylori</i>	5
Respuesta Inmunológica del Hospedero Ante la Infección por <i>H. pylori</i>	7
Impacto Epidemiológico de la Infección por <i>H. pylori</i>	9
Métodos Empleados en la Identificación de <i>H. pylori</i>	10
Aplicación de la Proteomica y Marcadores Patológicos Asociados a la Infección por <i>H. pylori</i>	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Población de Estudio.....	18
Cultivo de <i>H. pylori</i> 43504	18
Obtención de los Extractos Proteicos.....	18
Evaluación del Título de Anticuerpos	19
Inmunodetección	19
Análisis de las Proteínas de <i>H. pylori</i> ATCC 43504 en Doble Dimensión	20
Preparación de la Muestra.....	20
Isoelectroenfoque	21
Equilibrio	21

SDS-PAGE y Electortransferencia	22
Inmunodetección	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Obtención de Extractos Proteicos	23
Inmunorreconocimiento de Sueros.....	23
Identificación de Bandas Inmunorreactivas a Proteínas de <i>H. pylori</i>	26
Análisis de Manchas	29
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores prácticos obtenidos para las proteínas de la cepa <i>H. pylori</i> 43504, separados por 2DE.....	34
II	Reconocimiento de sueros de individuos UBT ⁺ a proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 resuelto por 2DE.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Perfil de proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 en gel de poliacrilamida al 12%.....	24
2	Detección de anticuerpos IgG séricos de individuos analizados con la UBT, con reconocimiento a proteínas <i>H. pylori</i> 43504.....	25
3	Sueros de individuos analizados por UBT con Inmunorreconocimiento a bandas proteicas de <i>H. pylori</i> 43504.....	28
4	Valores promedio de la densidad óptica de los sueros agrupados, con Inmunorreconocimiento diferencial entre los grupos de estudio.....	30
5	Perfil proteico de la cepa <i>H. pylori</i> 43504 separado 2DE con geles para isoelectroenfoque con margen lineal de pH 3-10...	32
6	Perfil proteico de la cepa <i>H. pylori</i> 43504 separado 2DE en geles para isoelectroenfoque con margen lineal de pH 5-8.....	33
7	Inmunorreconocimiento de la mezcla de sueros de individuos UBT ⁺ con las proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 separadas 2DE....	37
8	Inmunorreconocimiento de la mezcla de sueros de individuos UBT ⁻ con las proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 separadas 2DE....	39

OBJETIVOS

General

Identificar parcialmente las proteínas de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 reconocidas por sueros de individuos evaluados por la prueba de ureasa en aliento.

Particulares

- Determinar el perfil de proteínas de *H. pylori* ATCC 43504 mediante la técnica de electroforesis.
- Determinar los títulos de anticuerpos en el suero de los individuos analizados por la prueba de ureasa en aliento.
- Identificar el inmunorreconocimiento de los anticuerpos séricos de individuos analizados por la prueba de ureasa en aliento.
- Obtener el perfil de proteínas de la cepa 43504 de *Helicobacter pylori* mediante la electroforesis de doble dimensión (2-DE).
- Identificar la masa molecular y punto isoeléctrico de las proteínas inmunogénicas.

RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo multiflagelado, que infecta al 50% de la población mundial en alguna etapa de su vida asociado a gastritis, úlcera gástrica e incluso, cáncer gástrico. En los últimos tiempos la identificación y caracterización de proteínas inmunoreactivas de *H. pylori* han jugado un papel de suma importancia, empleando análisis proteómicos que combinan técnicas como electroforesis en doble dimensión, inmunodetección y espectrometría de masas principalmente, lo que ha representado la base del diseño de matrices de proteínas para el desarrollo de biomarcadores, pruebas de diagnóstico o pronóstico clínico, respuesta a fármacos o vacunas relacionadas con la enfermedad en estudio. En este trabajo se identificaron los valores prácticos (Mr/pl) de proteínas de *H. pylori* ATCC 43504 reconocidas únicamente por sueros de individuos evaluados por la prueba del aliento (UBT). Se observó reconocimiento a bandas de 35-36, 40-43, 48, 54-55, 60-65 y 87 kDa por individuos tanto positivos como negativos a la UBT (UBT⁺ y UBT⁻, respectivamente). En el caso de individuos UBT⁺ se reconocieron aproximadamente 27 proteínas, con márgenes de masa molecular aproximados de 23-123 kDa, y pl 5.5-6.48. En el reconocimiento encontrado por parte de la mezcla de sueros de individuos UBT⁻, se observaron alrededor de 22 proteínas, con márgenes aproximados de masa molecular de 28-94 kDa y pl 5-7. Con lo anterior, se propone el estudio de las proteínas reconocidas por individuos UBT⁺ con la finalidad de generar una mejor herramienta serológica para la detección de *H. pylori*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*), fue aislado por primera vez en 1982 por los científicos Warren y Marshall, a partir de tal acontecimiento, se han realizado miles de estudios que demuestran que es un bacilo Gram negativo, microaerofílico, multiflagelado (Montecucco y col., 1999), que presenta forma espiral cuando coloniza el estómago (Anzures, 2001), hecho que ha impactado a la comunidad médica y científica, y ha permitido considerarlo como el principal agente causal de enfermedades gástricas (Aguilar y col., 2001).

Actualmente no se ha definido claramente cuál es el mecanismo específico que le confiere su potencial de patogenicidad (Aguilar y col., 2001). Sin embargo se ha logrado establecer que posee una gran variedad de proteínas como ureasa (Penta y col.2005), adhesinas, VacA, CagA, entre otras, que son factores importantes al momento de interactuar con su hospedero y estimular la respuesta inmunológica, que resulta en un proceso inflamatorio (Penta y col., 2005), que puede persistir a través de los años, y producir complicaciones como gastritis, atrofia, displasia y metaplasia, condiciones fuertemente asociadas con el desarrollo de cáncer de estómago (Aguilar y col., 2001).

Entre los avances que se han logrado obtener, destaca la secuenciación completa del genoma de múltiples cepas de *H. pylori* (26695, J99, hpag1, Shi470, P12 y G27), lo que ha revelado una gran diversidad genética (Baltrus y col., 2009), pero aún queda mucho por resolver, ya que se desconoce la función de las proteínas codificadas por el 40% de sus genes (Marshall, 2002).

En los últimos tiempos la identificación y caracterización de proteínas inmunoreactivas de agentes patógenos han jugado un papel de suma importancia, y ha representado la base del diseño de matrices de proteínas para el desarrollo de biomarcadores, pruebas de diagnóstico o pronóstico clínico (Lin y col., 2006), respuesta a fármacos o vacunas relacionadas con la

enfermedad en estudio (Lock y col., 2002). En el análisis proteómico de cepas de *H. pylori* reportado por Jungblut y col., donde emplearon 2DE lograron separar 1863 especies proteicas para la cepa ATCC 26695, 1448 para la cepa SS1 y 1622 para J99, aunque las proteínas comunes entre las 3 cepas, que se identificaron por espectrometría de masas fueron UreB, Cag26, VacA, CagB, Catalasa, SodB, HpaA, UreA y GroES, como factores de virulencia comunes (Díaz-Macías, 2009).

Todo esto, ha representado un reto en el desarrollo de métodos eficientes para la detección oportuna de la bacteria. Se han desarrollado una gran variedad de los mismos, sin embargo, su selección dependerá de la finalidad diagnóstica, sensibilidad o especificidad deseada para cada estudio, así como el costo del mismo.

Hasta la fecha se ha considerado como estándar de oro el análisis de urea marcada en aliento, sin embargo, su disponibilidad ha representado el mayor obstáculo para su utilización. En contraparte, los análisis serológicos han presentado la ventaja de ser relativamente accesibles, rápidos, simples de ejecutar, económicos y poco invasivos. La utilidad de estos análisis va a depender de la selección y preparación de antígenos que utilicen, por lo que es necesario evaluarlos antes de aplicarlos a una población determinada (Laheij y col., 1998).

Estos métodos han permitido estimar que la infección por *H. pylori* afecta a más del 50% de la población mundial (Penta y col., 2005). En México en el año de 1999 se reportó una seroprevalencia del 66%, coincidiendo esta cifra con la reportada en Sonora para el mismo año (Leal y col., 1999). En un estudio realizado en el 2007, se analizaron sueros de pacientes del Hospital General del Estado de Sonora en busca de anticuerpos IgG contra *H. pylori*, mediante la técnica ELISA; se encontró que solo un 15.7% los sueros estudiados reconocen a la cepa 25 de *H. pylori*. Comparando estos resultados con los obtenidos al

evaluar la misma población con dos sistemas comerciales, observamos una gran variabilidad en los mismos, por lo que consideramos necesario, identificar las principales proteínas inmunorreactivas para la población de estudios y así poder establecer posibles biomarcadores afines.

ANTECEDENTES

Características Generales de *H. pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria que puede presentar forma espiral, bacilar o cocoide dependiendo de las condiciones que presente su entorno, mide de 2-4 μm de largo y de 0.5-1 μm de ancho. Presenta de 4-6 flagelos que le confieren movilidad (Johannes y col., 2006). Al realizar tinción Gram se observan bacilos Gram negativos, y se caracterizan bioquímicamente por la presencia de las enzimas ureasa, catalasa y oxidasa (Harris y col., 2006).

El cultivo y aislamiento *in vitro* de *H. pylori* han representado una de las principales dificultades para su estudio, considerándolo un microorganismo fastidioso debido a que son necesarias condiciones muy específicas para su desarrollo (Vega y col., 2003). Su crecimiento está condicionado a la presencia de un ambiente microaerofílico (2-5% de O_2 y 5-10% de CO_2), una temperatura de 37°C, un pH neutro y medios suplementados con sangre o suero. Su aislamiento se puede obtener dentro de un periodo de 5-7 días partiendo de un aislamiento primario de 48-72 hrs (Johannes y col., 2006).

Desde su descubrimiento por Warren y Marshall en 1982, hasta la fecha, se han publicado miles de trabajos que demuestran el impacto que ha tenido *H. pylori* como agente causal de enfermedades gástricas (Aguilar y col., 2001). Entre los avances que se han logrado obtener, destaca la secuenciación completa del genoma de 6 cepas de *H. pylori*: la 26695, J99, hpag1, Shi470, P12 y G27 (Baltrus y col., 2009), siendo el primer organismo para el que se han secuenciado múltiples cepas, lo que ha revelado una gran variedad genética a nivel de secuencias y de contenido en genes. Sin embargo, aún se desconoce la funcionalidad que presenta aproximadamente el 40% de su genoma (Díaz-Macías, 2009). Es por eso la necesidad de identificar, aislar, caracterizar y

analizar el papel que desempeñan diversos antígenos proteicos de *H. pylori* en la inducción de una respuesta inmune.

Proteínas de *H. pylori*

Algunos estudios relacionados con el proteoma de *H. pylori* han permitido proponer diferentes mecanismos mediante los cuales los antígenos de la bacteria interactúa con su hospedero (Díaz-Macías, 2009).

En primer lugar, *H. pylori* llega a su nicho biológico, el estómago, donde utiliza algunas proteínas indispensables para la colonización de la bacteria; implicadas encontramos a la flagelina (Kanishtha y col., 2008) codificadas por *flaA* y *flaB*, que conforma a los flagelos que le permiten a *H. pylori* tener un transporte activo a través de la superficie de la mucosa y poder así introducirse con rapidez en la capa de moco del estómago (Hardin y col., 2002) impulsado además por sus movimientos en forma espiral (Marais y col., 1999).

Al mismo tiempo *H. pylori* produce la enzima ureasa, la cual es una proteína de masa molecular aproximada de 540 kDa (Dunn y col., 1997), que le facilita la colonización de la mucosa gástrica, puesto que altera el microambiente ácido de este sitio anatómico. Recientemente Sachs y colaboradores (2003) identificaron parte del mecanismo mediante el cual es capaz de sobrevivir en ambiente hostil, describieron un gen Urel (Israel y col., 2001), que produce una proteína que regula la transferencia de urea del medio externo del estómago hacia el citoplasma de *H. pylori* mediante canales que atraviesan la membrana celular. Cuando el medio externo es excesivamente ácido, los canales incrementan 300 veces la cantidad de urea que entra al citoplasma de la bacteria y ello resulta en la suficiente producción de amonio para neutralizar el periplasma de la bacteria. Este es su principal mecanismo de adaptación, defensa y sobrevivencia ante condiciones hostiles (Sachs y col., 2003). En

contraparte también participa la enzima adenosina trifosfatasa, que previene la producción excesiva de un ambiente alcalino por parte de la ureasa.

Una vez que *H. pylori* ha penetrado en la mucosa gástrica, utiliza una gran variedad de adhesinas para interactuar mediante fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas con receptores de la superficie de las células del hospedero (Dubreuil y col., 2002), jugando un papel importante los péptidos nombrados “*cecropinas*”, que inhiben el crecimiento de organismos competitivos (Hardin y col., 2002), lo que permite que la bacteria pueda colonizar este sitio, donde libera una gran cantidad de proteínas como catalasa, superóxido dismutasa, proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP), factor activador de plaquetas (PAF), y otros factores como LPS que activan la respuesta inmunológica, generando una cascada de eventos que originan un proceso inflamatorio, el cual participa en el daño de la mucosa gástrica atribuido a la infección por *H. pylori*.

Sin embargo, a pesar del daño atribuido a la respuesta del hospedero, también están implicadas algunas cepas consideradas con mayor virulencia, que producen proteínas altamente inmunogénicas. Una de ellas, es la Toxina Vacuolizante (VacA), que es una proteína multimérica de 95 kDa (Johannes y col., 2006), que forma poros en las membranas de las células epiteliales (Blaser y col., 2004) y desencadena una serie de señales celulares y procesos hiperproliferativos que determinan mayor riesgo de transformación maligna (González-Morales, 2004). Otro factor que influye fuertemente en la patogenicidad de algunas cepas, es la presencia de la isla de patogenicidad *cag*, la cual es una región de ADN que contiene de 30 a 40 genes, que codifican factores de virulencia, incluyendo el gen *cagA*, encargado de codificar la proteína *cagA*, que tiene una masa molecular de 120 kDa (Marais y col., 1999), la cual es introducida por *H. pylori* al citosol de las células epiteliales mediante un sistema de secreción tipo IV; una vez en el citoplasma la proteína CagA es fosforilada en grado variable, a mayor fosforilación, mayor potencial oncogénico

de la cepa. Las cepas que expresan estas proteínas inducen mayor producción de citocinas inflamatorias como la IL-8 e inducen la proliferación y apoptosis celular (Kanishtha y col., 2008). En los últimos tiempos también se ha dirigido la atención hacia un posible papel patogénico de las proteínas de membrana, como la proteína de la membrana externa de 34 kDa que es codificada por *oipA*, donde Yamaosha y colaboradores observaron que en pacientes *cagA* positivos también se presentaba una copia intacta de *oipA*, y al cultivarse *in vitro*, induce IL-8, cuando se inactiva *oipA* se disminuye aproximadamente en un 40% la producción de IL-8.

Respuesta Inmunológica del Hospedero Ante la Infección por *H. pylori*

Cuando *H. pylori* interactúa con las células del epitelio gástrico se generan estímulos que propician una fuerte respuesta inmunológica (Echarri y col., 1998). En primera instancia la respuesta inmunológica innata es activada mediante el reconocimiento que se da por parte de receptores TLRs (Toll Like Receptors) (Blaser y col., 2004) presentes en las células del epitelio gástrico, las cuales liberan estímulos químicos para atraer a células dendríticas y monocitos. Estas últimas producen citocinas proinflamatorias como TNF- α (factor de necrosis tumoral), IL-1 β e IL-8. La persistencia de la infección por *H. pylori* incrementa los niveles de estas citocinas y actúan como quimioatrayente induciendo la infiltración de granulocitos (Portal-Celhay y col., 2006). Por otra parte, también se encuentran implicados en el reconocimiento de la respuesta innata los receptores de la familia Nod, que son estimulados fuertemente por el peptidoglucano presente en *H. pylori*, y estos también promueven una fuerte respuesta inflamatoria (Johannes y col., 2006).

Sin embargo, a pesar de una fuerte respuesta generada, la infección por *H. pylori* persiste a través de los años, puesto que la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten evitar la aclaración del sistema inmune. Por una parte su ubicación le ha dado una larga vida de colonización y ha demostrado

su efectividad para minimizar los daños que la estimulación inmunológica pudiera causarle, esto mediante diferentes mecanismos; por ejemplo sus flagelos están cubiertos por lípidos que mimetizan el reconocimiento por los TLR5 que normalmente reconocen los flagelos bacterianos, su ADN es altamente metilado, lo cual disminuye la activación por parte de los TLR9, que reconoce ADN no metilado de las bacterias y además *H. pylori* tiene un lipopolisacarido anérgico, debido a diversas modificaciones en lípidos esenciales, estas son solo algunas de las estrategias que la bacteria utiliza para su beneficio (Portal-Celhay y col., 2006).

A pesar de esto, la respuesta inmunológica sigue su curso y se activan mecanismos específicos de la respuesta celular que amplifican la respuesta inflamatoria (Piñol y col., 1999). También participa la respuesta humoral, observando la producción de altos títulos de anticuerpos específicos de tipo IgM, IgG e IgA dirigidos específicamente contra la bacteria, presentes tanto en la mucosa gástrica inflamada de pacientes infectados como a nivel sistémico. En modelos animales se ha observado que la inmunización con sonificados o proteínas de *H. pylori*, generan un incremento en los niveles de IgA e IgG, y se piensa que juegan un papel protector. En muestras de biopsia asociadas con la infección se ha observado que estos anticuerpos recubren a la bacteria. Existen autores que aseguran que la producción de anticuerpos IgA, limita el crecimiento de la bacteria y reduce la toxicidad de la misma, puesto que en modelos animales la administración oral de estos anticuerpos dirigidos contra *H. pylori* erradica la infección, lo cual se ha comparado con niños de madres infectadas que presentan altos títulos de anticuerpos lo que retrasa la adquisición de la infección. Además los sujetos con deficiencia de anticuerpos IgA, son más susceptibles a la infección por *H. pylori*, y notablemente aumenta el riesgo de desarrollar malignidades gástricas. Aun así la respuesta específica no está sesgada a un tipo particular de isotipos y se considera que la producción de IgG, es un marcador de la infección con mayor especificidad y

sensibilidad (90%). En contraparte existen autores que discuten el papel que juega esta respuesta humoral ante la colonización de la bacteria, puesto que puede causar daños por reacción cruzada con algunos antígenos del hospedero, lo que puede precipitar un proceso autoinmune (Kanishtha y col., 2008).

Impacto Epidemiológico de la Infección por *H. pylori*

Desde su descubrimiento y caracterización, *H. pylori* ha sido implicado en la fisiopatología de enfermedades gastroduodenales, dando origen a numerosas hipótesis que tratan de explicar los diferentes eventos que ocurren en el proceso inflamatorio del estómago desde su llegada (Aguilar y col., 2001).

Representa la infección crónica bacteriana distribuida alrededor del mundo más común en humanos, estimándose que el 50% de la población mundial la ha adquirido en alguna etapa de su vida, sugiriendo que la infección se establece en edades tempranas (Portal-Celhay y col., 2006) y persiste en un estado de latencia a través de los años sin propiciar la manifestación de síntomas en 80% de los infectados (Fuentes y col., 2009). Por otra parte, los mecanismos de transmisión también son motivo de controversia de este tema, pero se considera que la transmisión oral-oral u oral-fecal son las más factibles (Szczepanik, 2006), debido a que la seroprevalencia está relacionada con factores que predisponen la infección, entre ellos se considera: bajo nivel socio-económico, hacinamiento, convivencia con familias numerosas e hijos pequeños, pobres condiciones de salud, contaminación de alimentos y agua, y se ha observado que en países industrializados la prevalencia de la infección por *H. pylori* es menor comparada con países emergentes.

La evolución de la infección es muy variable, sin embargo se sabe qué factores relacionados con la bacteria (virulencia), el hospedero (predisposición genética, reacción inflamatoria adjunta), y el medio ambiente (dieta y estilo de

vida) influyen en grado considerable (Fuentes y col., 2009). Actualmente se discuten los mecanismos exactos mediante los cuales la infección por *H. pylori* progresa al menos a tres tipos de patologías gastrointestinales como son: gastritis leve, úlcera duodenal y cáncer gástrico (Serrano y col., 2009). Pero existe evidencia epidemiológica que respalda estas implicaciones.

La prevalencia de la infección en los países emergentes y de América central es del 70-90% (Corti, 2009) y en México se ha reportado una prevalencia del 66% (Torres y col., 1998), en contraste con los países desarrollados como Australia 20%, EUA 30%, Canadá 30% y Suiza 7%. Además en estos países la recurrencia de la infección es entre 1-5% al año. En contraparte los estudios realizados en países emergentes, determinan una tasa de recurrencia en México del 22.7% (Corti, 2009). En 1994 la Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer, clasificó a *H. pylori* como carcinógeno tipo I (Fuentes y col., 2009). Actualmente se considera que la personas infectadas con esta bacteria tienen un riesgo seis veces mayor de presentar cáncer gástrico (CG), pero solo menos del 3% lo desarrollará. Datos del INEGI del año 2006, revelaron que en México el CG es la cuarta causa de muerte por cáncer en varones y la quinta en mujeres.

Métodos Empleados en la Identificación de *H. pylori*

El sitio anatómico que coloniza *H. pylori*, representa cierta dificultad para analizar su presencia (Christopher y col., 1997). A pesar de esto, se han desarrollado varias pruebas para su detección, cada una tiene ventajas y desventajas particulares y la elección de una prueba específica va depender de las necesidades individuales del paciente (Johannes y col., 2006).

Generalmente estos métodos se dividen en dos tipos, los que se basan en muestras que se obtienen de forma invasiva como histología o cultivos de muestras de biopsia gástrica, que detectan directamente la presencia de la

bacteria (Johannes y col., 2006). Y otros métodos menos invasivos que utilizan sangre, orina, heces, aliento, saliva y que permiten detectar; anticuerpos, antígenos proteicos (como la ureasa), entre otros analitos y asociarlos indirectamente con la infección (Christopher y col., 1997).

Son pocos los métodos considerados como estándar de oro, y es necesario emplearlos para validar un nuevo test diagnóstico. Para el caso de *H. pylori* los estándares de oro más comúnmente usados durante muchos años han sido el cultivo y la tinción histológica de muestras gástricas obtenidas por endoscopia (Christopher y col., 1997), procedimiento que ha representado elevados costos y conlleva implícitos ciertos riesgos y molestias para los pacientes, además de que pueden dar resultados falsos negativos (Barriga y col., 2004).

Por otra parte, actualmente la denominada prueba de aliento, también han sido consideradas como estándar de oro en gran cantidad de estudios (Barriga y col., 2004), estas pruebas se basan en el hecho de que *H. pylori* produce grandes cantidades de la enzima ureasa, que tiene actividad ureolítica, la cual se analiza dándoles a ingerir a los pacientes una solución que contiene urea marcada con C^{13} o C^{14} , si la enzima está presente en mucosa gástrica, hidroliza la urea marcada (Christopher y col., 1997), lo que genera la producción de amonio y CO_2 marcado, este último es absorbido por el torrente sanguíneo y se intercambia en los pulmones, finalmente es exhalado y puede ser detectado mediante espectrometría de masas, considerándolo como un marcador de la presencia de la bacteria. Esta prueba tiene una sensibilidad del 97-100%, y especificidad del 95-100%. Sin embargo tiene sus marcadas desventajas, en primer lugar que el equipo empleado es complejo y costoso, por lo tanto no está disponible para toda la población, y en segundo lugar que también es considerado invasivo por la administración de la urea a los pacientes (Emel, 2008) y por lo tanto no es recomendado para embarazadas y niños (Christopher y col., 1997).

Existen además otros métodos que si bien no son considerados como estándar de oro, tienen mayor accesibilidad a la población en general, dentro de los cuáles juegan un papel importante las evaluaciones serológicas, donde se evalúa la presencia de anticuerpos específicos contra *H. pylori* en los pacientes (James, 2003). Son ampliamente usados, puesto que son menos invasivos, son sencillos de realizar y son baratos en comparación de los métodos anteriores, esto hace posible su disponibilidad (Deankanob y col., 2006).

Para estos análisis serológicos se han adaptado diferentes técnicas, incluyendo aglutinación en látex y ELISA, entre otros procedimientos, que se encuentran disponibles en kits comerciales (Christopher y col., 1997), con una sensibilidad y especificidad del 92 y 83%, respectivamente. En estas pruebas serológicas, principalmente analizan la presencia de anticuerpos IgG, puesto que se ha observado un rendimiento superior, en comparación a los ensayos que miden anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) al mismo tiempo o IgA solamente (James, 2003).

En estos ensayos, utilizan antígenos o mezcla de antígenos asociados a proteínas de superficie o citosólicas, obtenidas mediante extracciones ácidas o lisados celulares (sonicados), que son relativamente fáciles de preparar (James, 2003), solo se debe tener buen control de calidad en la preparación de diferentes lotes, por lo que inicialmente se deben estandarizar las condiciones de producción principalmente del medio y atmósfera empleada en el crecimiento de la bacteria, el buen control de tales condiciones se reflejará en la reproducibilidad de los distintos lotes de antígenos producidos, que se pueden comparar al observar sus perfiles proteicos en SDS-GEL, o ensayando con sueros control.

Se ha observado que al utilizar extractos proteicos de varias cepas se pueden generar reacciones cruzadas, produciendo resultados falsos positivos, sin embargo estos efectos se pueden minimizar empleando una sola cepa,

validando la técnica desarrollada, para lo cual se deben determinar las condiciones y combinaciones óptimas que determinan el sistema de trabajo, como la concentración de antígenos y dilución óptima de sueros, posteriormente se deben analizar un número significativo de muestras de varios pacientes que cumplan con todas las variables identificadas para la población de estudio, como edades y la presencia de enfermedades asociadas. Además se debe ajustar el valor de corte en diferentes ciudades para prevenir falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos de reacción cruzada y estos resultados compararlos con un método estándar que permita estimar la sensibilidad y especificidad de cada prueba (Christopher y col., 1997).

Antes de emplear estas pruebas se debe considerar que los niveles de anticuerpos en suero pueden persistir muchos años, por lo tanto pueden seguir apareciendo como prueba positiva aun cuando la infección ha sido erradicada, puesto que es difícil distinguir entre una infección activa o exposiciones previas (Thomas y col., 2006), además estas pruebas son poco confiables en personas con pobre producción de anticuerpos (Emel, 2008). Si los resultados son negativos y la clínica sigue indicando alta sospecha de infección por *H. pylori*, se recomienda realizar otro método como el de la prueba de ureasa en aliento (UBT, por sus siglas en inglés) para confirmar el diagnóstico. También podría considerarse realizar endoscopia y obtener biopsia de mucosa gástrica y realizar cultivos, exámenes histológicos o el test rápido ureasa (James, 2003).

Normalmente la elección del método ideal para la identificación de *H. pylori* dependerá de cada situación, en investigación se utiliza combinar varios métodos, en la práctica clínica generalmente se utiliza una única prueba y la mayoría de las pruebas son lo suficientes precisas. Para propósitos de diagnóstico de rutina y en atención hospitalaria se han utilizado mucho las pruebas invasivas mediante la obtención de muestras por endoscopia y la realización de tinciones histológicas o cultivo, aunque actualmente se ha introducido el test de la urea marcada en aliento y los análisis serológicos, sin

embargo estos últimos se utilizan más para estudios epidemiológicos o como un estudio primario en pacientes que no manifiestan complicaciones severas. En el caso de niños se usan pruebas menos invasivas como la detección de antígenos en heces o la reacción en cadena de la polimerasa (Christopher y col., 1997).

Por otra parte los estudios serológicos han demostrado gran variedad de antígenos de *H. pylori* principalmente mediante la técnica Western Blotting, el cuál se usa en el serodiagnóstico y tiene alta tasas de sensibilidad. Con esto se ha observado que hay proteínas y genotipos de *H. pylori* específicos, que han asociado su presencia con enfermedades específicas, considerando ciertas proteínas como marcadores patológicos (Christopher y col., 1997).

Aplicación de la Proteómica y Marcadores Patológicos Asociados a la Infección por *H. pylori*

En los últimos tiempos la identificación y caracterización de proteínas inmunoreactivas de agentes patógenos han jugado un papel de suma importancia, esto, gracias a la capacidad de selección que presentan los anticuerpos hacia antígenos específicos de estos organismos infecciosos (sean autoantígenos o proteínas específicas del cáncer), lo que ha representado la base del diseño de matrices de proteínas para el desarrollo de biomarcadores, pruebas de diagnóstico o pronóstico clínico (Lin y col., 2006), respuesta a fármacos o vacunas relacionadas con la enfermedad en estudio (Lock y col., 2002).

Estos diseños se apoyan principalmente en un conjunto de técnicas que se engloban en el término proteómica (Caballero y col., 2006). Esta disciplina se define como el estudio del proteoma, el cuál se refiere al conjunto de proteínas de un orgánulo, célula, tejido u organismo completo (Corrales y col., 2006) codificadas por su genoma en un estadio fisiológico determinado, lo cual permite diferenciar la expresión de proteínas de una célula o tejido enfermo de

uno sano. También permite caracterizar las redes funcionales que establecen estas proteínas diferenciales y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos. Por esto, la proteómica se ha considerado una herramienta poderosa en el estudio de comparación de proteínas sintetizadas por cepas bacterianas virulentas y no virulentas.

Actualmente no existe un diagrama de flujo único para el análisis proteómico de una muestra, ya que las variables como complejidad, método de separación, concentración y estabilidad de las proteínas, además de la plataforma tecnológica disponible para su análisis, y muy especialmente el tipo de pregunta biológica que se pretende abordar, son los parámetros básicos que determinan la elección de una estrategia.

Sin embargo una de las técnicas de separación de proteínas por excelencia es la electroforesis en doble dimensión (2DE). En este caso las proteínas se separan en una primera dimensión en función de su punto isoeléctrico, para posteriormente, separarse ortogonalmente en una segunda dimensión en función de su masa. Esto da lugar a una serie de puntos, cada uno de los cuáles corresponde a una proteína. Finalmente es recomendado utilizar otras técnicas para identificar las proteínas separadas, siendo de especial importancia para ello la espectrometría de masas.

En la caracterización de proteínas de *H. pylori*, se ha utilizado la comparación cualitativa de sus múltiples cepas, las cuales se toman de biopsias obtenidas mediante endoscopia de tejidos gástrico, de las cuales se extraen sus proteínas y se hacen reaccionar con sueros de pacientes con gastritis crónica, úlcera duodenal y carcinoma gástrico difuso (Díaz-Macías, 2009). Estos análisis proteómicos se han realizado mediante la combinación de 2DE e inmunoblotting, los cuales son altamente sensibles y específicos ya que solamente revelan las manchas que realmente tienen una reacción antígeno

anticuerpo, lo que nos proporciona importantes datos de posibles biomarcadores de dichas patologías (Díaz-Macías, 2009).

Aunque son muchos los factores de virulencia que se han identificado, realmente son pocos los reportes que demuestran una asociación clara entre la patogénesis y la infección debida probablemente a que estas son enfermedades clínicamente divergentes.

Tomando como base la secuenciación genómica de la cepa de *H. pylori* 26695 se encontraron alrededor de 1200 interacciones entre proteínas de este microorganismo, asociando ha esto el 46.6% de su proteoma (Díaz-Macías, 2009). En el análisis proteómico de las cepas de *H. Pylori* ATCC 26695, J99 y SS1, reportado por Jungblut y col., (2000) se encontraron muy pocas proteínas comunes entre las 3 cepas, aunque lograron separar 1863 especies proteicas para *H. pylori* 26695, 1448 para la cepa SS1 y 1622 para J99, estos mediante 2DE, y empleando espectrometría de masas (MS) se identificaron 152 proteínas; incluyendo 9 factores de virulencia como UreB, Cag26, VacA, CagB, Catalasa, SodB, HpaA, UreA y GroES comunes (Díaz-Macías, 2009).

Por otra parte, Lock y col., analizaron el proteoma de la cepa NCTC 11637 (ATCC 43504), donde identificaron 93 proteínas utilizando también 2DE y MS. Encontraron que presentaban niveles altos de UreA y UreB con múltiples isoformas: UreA (11 manchas) y UreB (5 manchas). También que esta cepa es cagA y vacA positivo (16 manchas fueron identificados como posibles productos de vacA) (Díaz-Macías, 2009). Además se han realizado estudios en la cepa 43504, para evaluar la expresión de proteínas bajo niveles de estrés oxidativo, donde los resultados evaluaron que alrededor de 10 proteínas de esta cepa se expresan bajo las condiciones mencionadas: UreE, AhpC, NapA, GroEL, UreB, CheY. El aporte más notable de este estudio es la identificación del comportamiento de UreE y AhpC (proteínas accesorias de ureasa), cuyo potencial antioxidante se ve disminuido ante tensiones de oxígeno al 20%,

inhibiendo de esta manera la actividad de la Ureasa hasta el punto de inhibir por completo su actividad a las 32 hrs (Díaz-Macías, 2009).

Estudios reportan que *H. pylori* expresa proteínas consideradas como biomarcadores, para el caso del de carcinoma gástrico los antígenos específicos asociado con esta infección fueron: UreB, Yihk, AcnB, Icd, Ffh, YmxG, GltA, PIB, NAD(P)H, factor 2 plegador de células, LytB, TagD, Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa subunidad γ , FabG, y CeuE. Los antígenos asociados por *H. pylori* en pacientes con ulcera fueron: GlnA, FrdA9, Cag 26 y Flavodoxina. Comparando estos datos con suero de pacientes negativos a la infección, reaccionaron solo algunas proteínas como: GroEL, UreA y Catalasa (Díaz-Macías, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

La población de estudio se seleccionó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, incluyendo los sueros de 70 individuos, que previamente fueron analizados con la prueba del aliento. Se incluyó en el estudio un total de 70 muestras, de las cuales 42 fueron positivos (UBT⁺) y 28 negativos a la UBT (UBT⁻) en un estudio realizado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), dirigido por la Dra Moya en el año 2007.

Cultivo de *H. pylori* 43504

Se utilizó la cepa de *H. pylori* ATCC 43504, fue proporcionada por el Dr. Humberto Astiazarán, la cual se cultivó en caldo infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con 20% de suero equino y los antibióticos; ácido nalidíxico 20 µg/mL, vancomicina 6 µg/mL y ketoconazol 3 µg/mL, incubándose en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 3-5 días, hasta obtener cultivos con crecimiento masivo (Ruiz-Bustos y col., 2001).

Obtención de los Extractos Proteicos

La extracción de proteínas se realizó partiendo de las células obtenidas de los cultivos con crecimiento masivo, las cuáles se lavaron con agua destilada con agitación de una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 800 g por 15 minutos a 16°C finalmente se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en Urea 3M (4 g de células /100mL), se colocó en agitación durante 1 hr a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante obtenido se dializó contra bicarbonato de amonio 0.01M durante 7 días con recambios cada 6-8 hrs. Una vez obtenido el extracto proteico se

analizó su concentración con el micrométodo de Bradford en placas de 96 pozos y se determinó el perfil obtenido empleando electroforesis SDS-PAGE y tinción plata. Los extractos se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su uso (Ruiz-Bustos y col., 2001).

Evaluación del Título de Anticuerpos

Se siguió el procedimiento empleado en un trabajo anterior (Rodríguez-Hernández, 2007) con algunas modificaciones. Se utilizaron diluciones seriadas de los sueros de los empleados; 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, empleando Anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:20,000 como anticuerpo secundario.

Inmunodetección

Primeramente se realizó una electroforesis SDS-PAGE, empleando un gel preparativo de poliacrilamida al 12% con 1 mm de espesor (anexo), agregando marcador de peso molecular (MPM BioRad). La corrida electroforética se realizó a 90 Volts hasta que el frente formado en el gel llegó a la parte final del mismo. Este procedimiento se realizó por duplicado, para lo cual un gel se tiñó empleando AgNO₃ (Anexo 2) y el otro se equilibró en buffer de transferencia por 5 minutos junto con un trozo de nitrocelulosa. Posteriormente se realizó la transferencia en el equipo (Thermo Scientific, OWL HEP-1), a 120 mA durante 45 minutos. Una vez terminada la transferencia se guardó la membrana en congelación hasta su uso. Se tiñó con rojo de ponceau la parte correspondiente al MPM. El resto de la membrana se cortó en tiras y cada una se analizó con un suero en diluciones adecuadas, siguiendo el procedimiento previamente establecido (Rascón-Durán, 2008), con algunas modificaciones, empleando como anticuerpo secundario Anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa diluido 1:20,000 y empleando como sistema de revelado la quimioluminiscencia siguiendo el protocolo del fabricante.

Análisis de las Proteínas de *H. pylori* ATCC 43504 en Doble Dimensión

Preparación de la Muestra

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas para los ensayos 2DE se probó lo siguiente:

En primer lugar, se probaron dos tratamientos previos a la resuspensión de la muestra para eliminar interferencias presentes en los extractos proteicos. El primer tratamiento empleado fue el recomendado por la casa comercial BioRad utilizando un kit de limpieza (ReadyPrep 2-D Cleanup Kit Anexo6) siguiendo el protocolo del mismo. El segundo tratamiento fue la precipitación con acetona fría al 80%, para lo cual se emplearon de 100-130 µg de proteína según cada caso, estos se resuspendieron en acetona fría obteniendo una dilución final del 80%, se disolvió el extracto en la acetona agitando en vórtex, se incubó a -20°C por 60 minutos, posteriormente se centrifugó a 13-15000 g por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento dos veces más. En el último caso se decantó y posteriormente se dejó secar al aire el exceso de líquido.

Una vez precipitada la proteína, se resuspendió en un volumen de 130 µL de buffer de rehidratación (7M Urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 50Mm DTT, 0.2% Bio-Lyte 5/8 ampholyte, Azul bromofenol) y se agitó fuertemente, dejando reposar la solución 5 minutos y se repitió una vez más la agitación. Posteriormente se centrifugó la muestra a 9300 g por 5 minutos a 4°C.

Se procedió a colocar la parte líquida de la muestra sobre un carril de la charola de rehidratación, se descubrió la parte plástica de la tira de poliacrilamida con gradiente de pH 5-8 (Bio-Rad) y se colocó lenta y firmemente sobre la muestra (evitando la formación de burbujas), se dejaron en reposo durante un periodo de 15 – 30 minutos, posteriormente se agregó 1 mL de aceite mineral (SIGMA) y se cubrió la charola, para rehidratar pasivamente el gel por 12 hrs a 25°C (Rascón-Durán, 2008).

Isoelectroenfoque

Al finalizar la rehidratación pasiva, se escurrió el exceso de aceite y se colocó la tira de poliacrilamida con la cara del gel hacia abajo en la charola para isoelectroenfoque (IEF) donde previamente se habían colocado en cada extremo dos pedazos de papel filtro humedecido con 8 μ L de agua MiliQ, cuidando que el signo marcado en la tira coincidiera con el marcado en la charola para IEF. Finalmente se cubre la tira con 1 mL de aceite mineral y se tapa con la cubierta de plástico diseñada para la misma.

Posteriormente se colocó la charola en la cámara de IEF (BioRad), y se programaron los siguientes parámetros a 20°C: 1) 100 voltios, 2 horas, rampa lenta; 2) 250 voltios, 20 minutos, rampa linear; 3) 4000 voltios, 2 horas, rampa linear y 4) 4000 voltios, 10000 voltios-hora, rampa rápida.

Cuando terminó la corrida se retiró la charola y se removieron las tiras, quitando el exceso de aceite y se colocaron en un tubo falcón con la cara del gel hacia arriba, donde se guardaron en congelación hasta su uso.

Equilibrio

Se tomaron las tiras y se esperó a que tuvieran temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en un falcon de 15 mL con la cara del gel hacia arriba, y se cubrió con solución de equilibrio I (anexo 4). Se incubó en agitación lenta por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el buffer I, se escurrió perfectamente y se colocó en otro tubo y se cubrió la tira con buffer de equilibrio II, dejándola en incubación bajo las condiciones antes mencionadas. Finalmente se escurrió el exceso de buffer, y se colocó la tira en otro tubo falcon con buffer de corrida para SDS-PAGE por 5 minutos. Se escurrió el exceso de líquido.

SDS-PAGE y Electrottransferencia

Se preparó un gel discontinuo de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de espesor (anexo 1), sobre el gel separador se colocó la tira de IEF previamente equilibrada, y se agregó la mezcla del gel concentrador, se añadió un peine para formar un pozo, donde se adicionó el MPM. Se dejó solidificar el gel por 15 minutos, aproximadamente, posteriormente se realizó la corrida a 200 volts por 54 minutos. Cada procedimiento se realizó por triplicado, un gel fue teñido con AgNO_3 (anexo 2) y los otros dos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 70 minutos bajo las condiciones previamente descritas.

Inmunodetección

Se utilizó el procedimiento descrito previamente, empleando una mezcla de sueros diluido 1:1000 que presentaban considerables títulos de anticuerpos y que tuvieron reconocimiento de alguna banda en la Inmunodetección en primera dimensión, se usaron dos grupos, uno de individuos que fue positivo a la UBT y otro negativo al mismo test.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Extractos Proteicos

Partiendo de cultivos con crecimiento masivo de la cepa *H. pylori* 43504, se obtuvieron extractos proteicos utilizando Urea 3M, y se estimó la concentración de proteínas empleando el micrométodo de Bradford, donde por cada cultivo de 300 mL con 7-10 días de incubación en condiciones de microaerofilia a 37°C, se obtuvo un valor proteico promedio de 300 µg/mL, generando un total de ~1 mg de proteína total. Al analizar su perfil proteico empleando electroforesis SDS-PAGE (Figura 1), se aprecian bandas con un margen de masa molecular aproximado entre 12 y 200 kDa. Al compararlo con lo publicado en la bibliografía, se encontró que éste perfil es similar (14-200 kDa) al reportado previamente por Doig y Trevor en 1994 para esta misma cepa.

Inmunorreconocimiento de Sueros

Una vez analizado el perfil proteico de los extractos obtenidos, éstos se utilizaron como antígenos en la técnica ELISA, para la evaluación de 70 sueros de individuos analizados por la prueba del aliento (42 individuos positivos y 28 negativos a la UBT). Esta técnica se empleó con la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos séricos IgG en cada individuo, para lo cual se emplearon diluciones seriadas, considerando como dilución de trabajo la de 1:200.

Al analizar los resultados se observó que el valor promedio de la densidad óptica de los sueros de individuos negativos a la UBT fue relativamente mayor (0.3) al valor promedio de la densidad óptica obtenido para los sueros de individuos positivos a la UBT (0.24) (Figura 2).

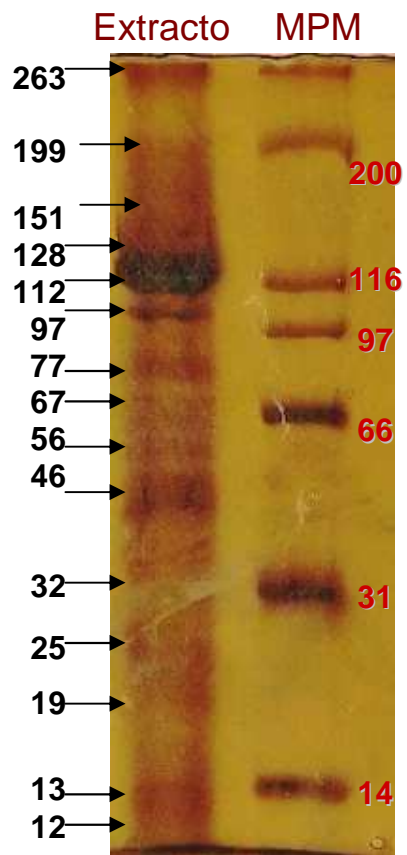


Figura 1. Perfil de proteínas de *H. pylori* 43504 en gel de poliacrilamida al 12%.
MPM: Marcador de masa molecular.

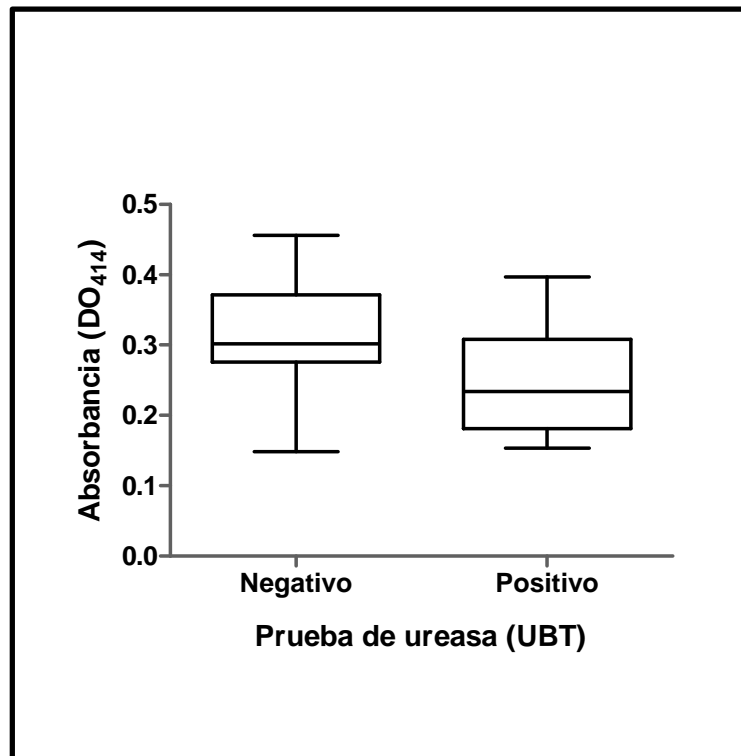


Figura 2. Detección de anticuerpos IgG séricos de individuos analizados con la UBT, con reconocimiento a proteínas *H. pylori* 43504.

Estos resultados muestran aparentemente un mayor reconocimiento por los anticuerpos IgG dirigidos contra proteínas de la bacteria en el caso de personas negativas a la UBT, es decir sin infección activa. Sin embargo no todos los individuos que son seropositivos tienen infección gástrica clínicamente significativa, y se ha documentado discrepancia entre la prevalencia de la infección y alta seropositividad (Bravo y col., 2000), lo que a su vez indica que las pruebas serológicas actuales no permiten distinguir una infección activa o pasada, por lo que en este estudio se utilizó como referencia el análisis de UBT.

Por otra parte, estudios realizados recientemente muestran evidencias de que en individuos infectados por *H. pylori* el índice de absorbancia serológica IgG contra la bacteria, se correlaciona con la severidad de la gastritis y la densidad de colonización de la bacteria, según discute Bravo y colaboradores (2000). En nuestro estudio no contamos con datos que nos permitan correlacionar estos indicadores, y hasta este punto es difícil establecer una discriminación en el inmunorreconocimiento de los grupos de individuos evaluados con el análisis de los datos obtenidos, lo que contrasta con otros estudios donde tratan de evidenciar que la presencia de la infección está asociada con altos títulos de anticuerpos. Sin embargo, a la fecha se emplean como valores de corte lecturas de absorbancia iguales o superiores a 0.1 para considerar una muestra seropositiva (Bravo y col., 2000; She y col., 2009), lo que hasta cierto punto puede ser incierto, puesto que es difícil la estandarización de un valor de corte funcional para todas las poblaciones, debido a que este dependerá de una gran cantidad de indicadores que serán reflejados por la necesidad de cada estudio (Bravo y col., 2000).

Identificación de Bandas Inmunorreactivas a Proteínas de *H. pylori*.

Una vez analizados los sueros mediante la técnica de ELISA y determinado que existen considerables títulos de anticuerpos IgG dirigidos contra antígenos de *H. pylori*, se evaluó la inmunoreactividad de los mismos hacia bandas

específicas de proteínas, empleando la técnica de Inmunotransferencia en una dimensión (WB-1D por sus siglas en inglés).

Se encontró un fuerte reconocimiento de la mayoría de los sueros dirigido a bandas de 17, 20-23, 25, 40-43 kDa por parte de los individuos infectados. También encontramos inmunorreconocimiento a bandas de 35-36, 40-43, 48, 54-55, 60-65 y 87 kDa por ambos grupos de individuos, como se puede observar en la figura 3, donde se aprecia que las bandas de menor masa molecular son reconocidas principalmente por individuos infectados, en comparación con las bandas reconocidas por ambos grupos, aunque se observó mayor frecuencia en el reconocimiento de estas bandas por el grupo de individuos infectados. Esto es similar a lo reportado por Chomvarin y col. en 2009, donde se discute la variabilidad en la presencia de patrones de reconocimiento en diferentes grupos de individuos, que no son estadísticamente significativas, aunque si se observan bandas con mayor frecuencia en grupos de pacientes infectados (89 kDa) y en no infectados (37 kDa).

Han sido revelados varios antígenos relevantes reconocidos por anticuerpos séricos en inmunoanálisis en 1D, incluyendo CagA (110-120 kDa), VacA (87 kDa), ureasa α y β (67 y 31 kDa), GroEL (60 kDa), flagelinas (50 kDa), p35 (35 kDa) y una de 26 kDa (Jungblut, 2000), que pudieran estar presentes en las bandas reconocidas por los individuos analizados en nuestro estudio. Por otra parte también se han identificado bandas específicas para grupos de pacientes con patologías determinadas, como es el caso de las reconocidas por sueros de pacientes con cáncer gástrico 106, 61.5, 45, 34 y 30 kDa (Farshad y col., 2006).

Con los resultados obtenidos por ELISA y por WB-1D, seleccionamos sueros para formar una mezcla de sueros de los individuos positivos y otro para individuos negativos a la UBT y poder utilizarlos en los ensayos de 2DE.

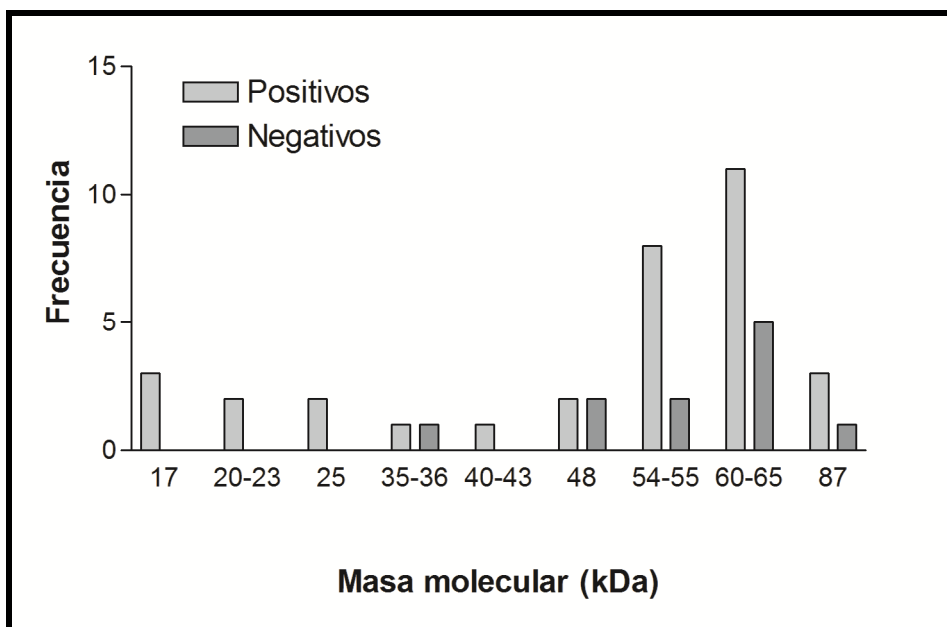


Figura 3. Sueros de individuos analizados por UBT con Inmunorreconocimiento a bandas proteicas de *H. pylori* 43504.

En el caso de los sueros de individuos positivos a la UBT, se seleccionaron todos aquellos que presentaron una absorbancia mayor a 0.3, y que tuvieran reconocimiento por al menos una banda en los ensayos WB. Para el caso de individuos UBT negativos, se consideraron los sueros con lecturas de absorbancia menores a 0.2. Esto nos permitió observar una diferencia en el Inmunorreconocimiento al promediar sus lecturas, como se puede observar en la figura 4.

Análisis de Manchas

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas para los ensayos en dos dimensiones se probó lo siguiente:

En primer lugar, se probaron dos tratamientos para eliminar interferencias presentes en los extractos proteicos. El primer tratamiento empleado fue el recomendado por la casa comercial BioRad empleando un kit de limpieza (ReadyPrep 2-D Cleanup Kit) siguiendo el protocolo del mismo. El segundo tratamiento fue la precipitación con acetona fría al 80%. Se observó mejor rendimiento al utilizar el segundo tratamiento, estableciendo así que la cantidad proteica por tira en corridas de doble dimensión fue de ~100 μg para ser teñidas con plata, y de ~120 μg para los procesos de inmunodetección (Western blot).

Inicialmente se emplearon geles para isoelectroenfoque con margen lineal de pH 3-10, y geles de poliacrilamida al 12%, sin embargo las proteínas no se separaron adecuadamente de la tira para isoelectroenfoque, por lo que se cambió la concentración del gel de poliacrilamida al 10%, y así permitir que las proteínas bajaran al momento de realizar la SDS-PAGE, además se modificó la composición original del gel concentrador. Se utilizó entonces un gel al 10% con el mismo margen de pH, observamos que migraron más las proteínas, sin embargo, no obtuvimos una buena separación, y seguimos observando un

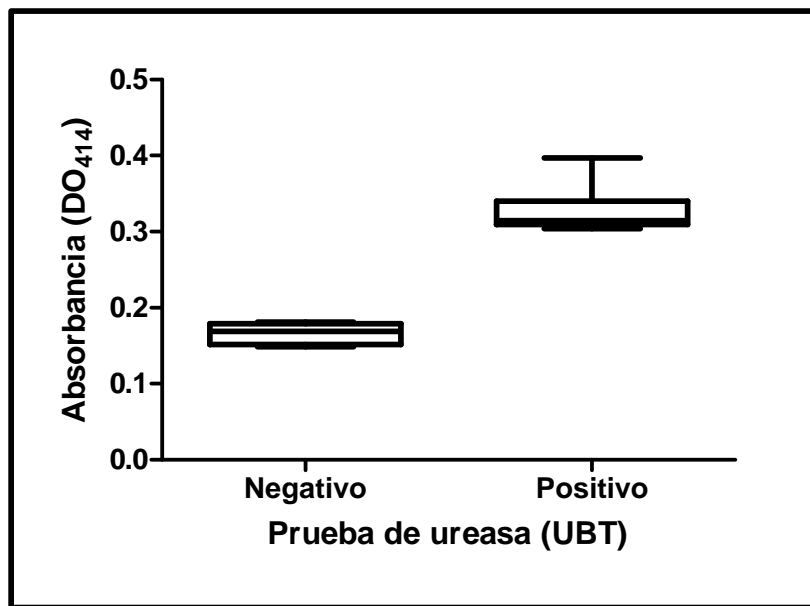


Figura 4. Valores promedio de la densidad óptica de los sueros agrupados, con Inmunoconocimiento diferencial entre los grupos de estudio.

fuerte grupo de proteínas acumulado en un margen de pH aproximado de 5 – 7 (figura 5), lo que en parte coincide con lo reportado en trabajos previos, donde señalan que al utilizar tiras para isoelectroenfoque de amplio margen, existe dificultad en la separación de las proteínas que se acumulan en un margen de pH 4.5 - 8 (Jeong-Won y col., 2007) muy cercanos al margen de pH señalado, por lo tanto recomiendan emplear tiras de isoelectroenfoque con márgenes de pH estrecho para obtener una mejor separación y resolución en los geles.

Atendiendo lo anterior, se procedió a emplear geles de isoelectroenfoque con un margen de pH 5 - 8, conservando las características del gel utilizado en SDS- PAGE. Se obtuvo mayor separación y presencia de manchas en el patrón observado bajo estas condiciones (figura 6), logrando identificar alrededor de 60 manchas, en un margen de masa molecular aproximado de 24 - 94 kDa, y pI 5 - 7 (Tabla I). Esto coincide con los reportes realizados por Jeong (2007) y Ming-Hong (2005), que mencionan que la expresión global proteica para diferentes cepas de *H. pylori* se muestra en una región con un margen 50 - 95 kDa y pI 4 - 6. Similares resultados también a lo reportado por McAtee y col. (1998) para el perfil proteico 2DE específico de la cepa 43504, con un margen pI de 4 - 8, y que ha mostrado una familia de proteínas de masa molecular aproximada de 89 kDa /6.8 pI, 66 y 58 kDa/6.5. Aunque el análisis del proteoma básico por comparación de composición de proteínas de tres diferentes cepas de *H. pylori* (26695, SS1 y J99) muestra proteínas repartidas en márgenes de 4-10 y Mw 5 - 150 kDa, en total 1863, 1448 y 1622 manchas de estas cepas respectivamente (Jungblut y col., 2000). Las manchas con patrones frecuentemente identificados son: GroEL, UreB, TsaA and CagA.



Figura 5. Perfil proteico de la cepa *H. pylori* 43504 separado 2DE con geles para isoelectroenfoque con margen lineal de pH 3 - 10.

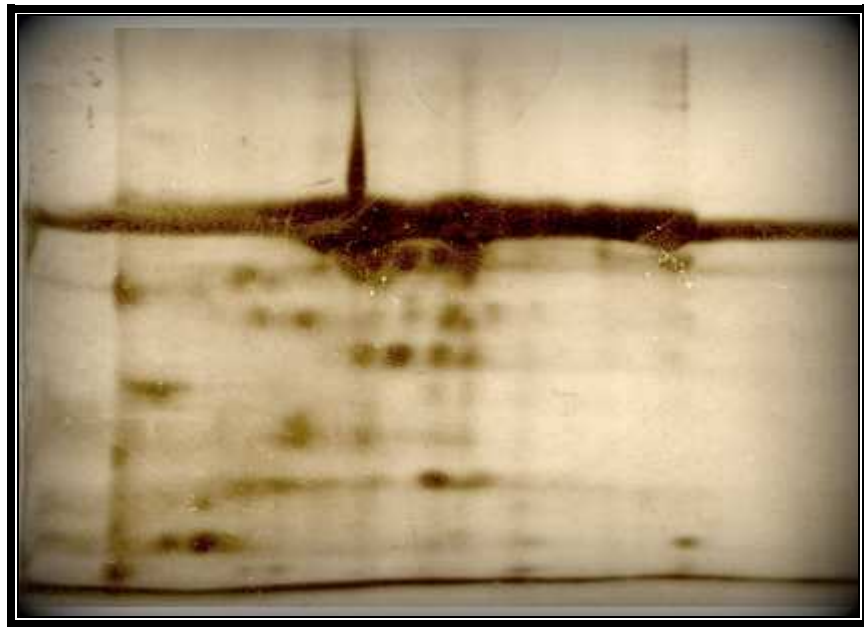


Figura 6. Perfil proteico de la cepa *H. pylori* 43504 separado 2DE en geles para isoelectroenfoque con margen lineal de pH 5 - 8.

Tabla I. Valores prácticos obtenidos para las proteínas de la cepa *H. pylori* 43504, separados por 2DE.

No. Mancha	Mr	pI	No. Mancha	Mr	pI
1	56.8	5.07	32	40.94	5.81
2	58.26	5.17	33	40.94	5.93
3	61.26	5.26	34	40.94	6.30
4	61.26	5.33	35	37.02	5.41
5	62.83	5.44	36	37.02	5.56
6	61.26	5.59	37	37.02	5.70
7	64.43	5.74	38	37.02	5.81
8	64.43	5.81	39	31.04	5.26
9	66.06	6.11	40	31.83	5.37
10	64.43	6.30	41	31.83	5.70
13	54.02	5.30	42	31.83	5.81
14	52.67	5.41	43	31.83	5.93
15	52.67	5.56	44	30.26	5.11
16	54.02	5.67	45	30.26	5.19
17	58.26	5.67	46	28.78	5.93
18	52.67	5.78	47	26.02	5.11
19	51.36	5.81	48	26.02	5.19
20	55.39	5.85	49	23.53	5.26
21	55.39	5.96	50	23.53	5.37
22	52.67	6.33	51	26.02	5.70
23	55.39	6.96	52	26.02	5.78
24	47.63	5.56	53	26.02	5.96
25	47.63	5.63	54	23.53	5.93
26	47.63	5.74	55	26.02	6.33
27	46.44	5.81	56	27.37	6.85
28	47.63	6.30	57	26.02	7.00
29	43.06	5.07	58	64.40	5.74
30	43.06	5.15	59	55.30	5.78
31	43.06	5.93	60	23.53	6.30

Se compararon los datos obtenidos (Mr/pI) con reportes previamente publicados, para identificar las posibles proteínas presentes en el perfil proteico (Tabla II). Sin embargo es necesario aislar estas manchas y obtener su secuencia de aminoácidos, para confirmar su identidad. Puesto que la comparación de diferentes patrones entre cepas revela alta variabilidad genética, algunas proteínas son encontradas en la misma posición, algunas presentan cambios de posición, y diferencialmente pueden estar presentes o ausentes en diferentes preparaciones de las cepas (Lock y col., 2002).

Con la finalidad de encontrar un patrón de reconocimiento diferencial entre individuos positivos o negativos a la UBT, se realizaron inmunodetecciones en ambas mezclas de sueros. Observamos que hubo fuerte reconocimiento de proteínas para ambos casos; referente a los individuos positivos a la UBT, se reconocieron aproximadamente 27 manchas (45% de las proteínas de superficie), con márgenes de masa molecular aproximados de 23-123 kDa, y pI 5.5-6.48 (figura 7). El análisis del perfil proteico de la cepa 43504 separado en 2DE, con margen de pH 4-8, ha mostrado al menos 17 manchas donde se encuentran familias de proteínas de aproximadamente 89 (pI 6.8), 66 y 58 kDa (6.5).

En el inmunoanálisis con mezcla de sueros de pacientes infectados, generalmente se encuentra reconocimiento hacia la: Ureasa subunidad β , ureasa subunidad β acoplada chaperona GroEL, piruvato flavodoxina oxidoreductasa y proteínas hipotéticas de la región cag, así como las proteínas correspondientes a las fracciones de la flagelina. Así mismo estudios han reportado encontrar similitud con la proteína activadora de neutrófilos, varias proteasas bacterianas, isocitrato dehidrogenasa Icd (McAtee y col., 1998; Kimmel y col., 2000).

Tabla II. Reconocimiento de sueros de individuos UBT⁺ a proteínas de *H. pylori* 43504 resuelto por 2DE.

Valores Prácticos Proteínas		Reportes Bibliográficos	
Mancha	Mr*/pI	Proteínas	Referencia
1	123.09/5.52	Carbamoyl fosfato sintetasa	Base Datos
2	123.09/5.56	Aconitasa B	Base Datos
3	123.09/5.63	No se encontró reporte	-
4	122.68/5.70	No se encontró reporte	-
5	115.50/5.85	No se encontró reporte	-
6	101.02/5.63	No se encontró reporte	-
7	94.47/5.70	NADH-Ubiquinona oxidoreductasa	Base Datos
8	82.63/5.63	No se encontró reporte	-
9	115.50/6	No se encontró reporte	-
10	108.02/6.04	Isoleucil-tRNA sintetasa	Base Datos
11	101.02/5.70	Fragmento CagA (Cag26)	Base Datos
12	94.47/5.82	Proteína hipotética	Base Datos
13	72.51/5.71	Chaperona y proteína de shock térmico	Base Datos
14	72.51/5.63	Chaperona y proteína de shock térmico	Jeong 2007
15	63.42/5.56	Subunidad B de ureasa/Urea amidohidrolasa	Base Datos
16	63.42/5.63	Subunidad B de ureasa	Ming 2005
17	59.11/5.85	Chaperona y proteína de shock térmico	Base Datos
18	55.28/5.81	Glutamina sintetasa	Base Datos
19	48.35/6.11	Proteína precursora de secreción de hemolisina	Kimel 2000
20	45.21/5.78	Piruvato ferredoxina oxidorreductasa, subunidad α	Kimel 2000
21	59.11/5.9	Subunidad B de ureasa (UreB)	Base Datos
22	30.25/5.59	Proteína hipotética	Jeong 2007
23	24.74/6.48	Superóxido dismutasa	Base Datos
24	24.74/5.63	No se encontró reporte	Ming 2005
25	23.14/5.59	Proteína accesoria de ureasa (UreG)	Base Datos
26	45.21/6.22	Piruvato flavodoxina reductasa	Base Datos
27	39.68/6.15	Proteína hipotética	Base Datos

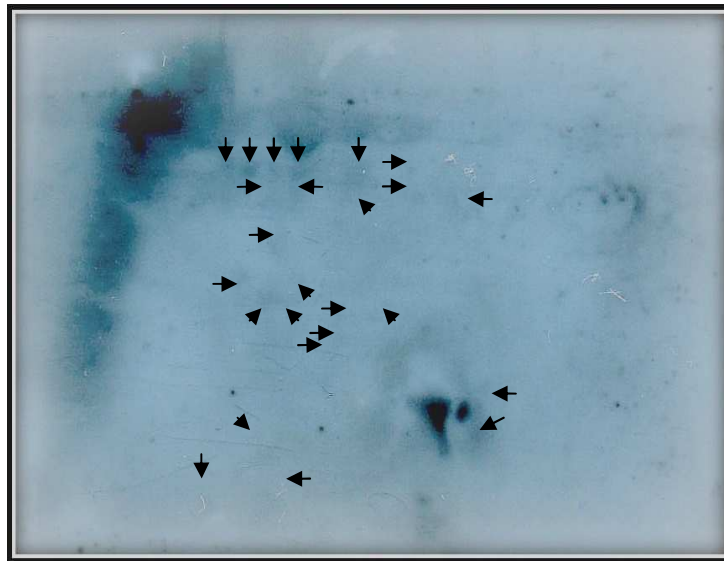


Figura 7. Inmunorreconocimiento de la mezcla de sueros de individuos UBT⁺ con las proteínas de *H. pylori* 43504 separadas 2DE.

En el caso del reconocimiento por parte de la mezcla de sueros de individuos negativos a la UBT, se reconocieron alrededor de 22 manchas (36.7% de las proteínas de superficie), con márgenes aproximados de masa molecular de 28-94 kDa y pI 5-7 (figura 8). Diferentes estudios han comparado el reconocimiento del perfil proteico separado 2DE de al menos 8 cepas de *H. pylori* (McAtee y col., 1998) con mezcla de sueros de pacientes negativos a la infección con esta bacteria, y abundantemente se reconocen: GroEL, ureasa subunidad α , catalasa (Jungblut y col., 2000), así como la subunidad β de la ureasa (McAtee y col., 1998).

Al comparar el Inmunorreconocimiento obtenido por los sueros de individuos positivos o negativos a la UBT, en la 2DE, observamos que hay un reconocimiento compartido por algunas manchas que coincide con reportes previos, sin embargo también encontramos un reconocimiento particular para el caso de los sueros positivos. De forma tal, que del total de las proteínas encontradas en el perfil proteico, observamos que el 17% presentó únicamente reconocimiento por mezcla de sueros de individuos UBT positivos, el 14% por individuos UBT negativos, mientras que el 5% presentó un reconocimiento compartido.

Así, es importante llevar a cabo un análisis más profundo de éste 17% del proteoma asociado a membrana de *Helicobacter pylori*, con la finalidad de determinar aquella(s) proteína(s) que en conjunto permitan detectar de una forma no invasiva, una infección activa asociada a éste patógeno gastrointestinal humano.

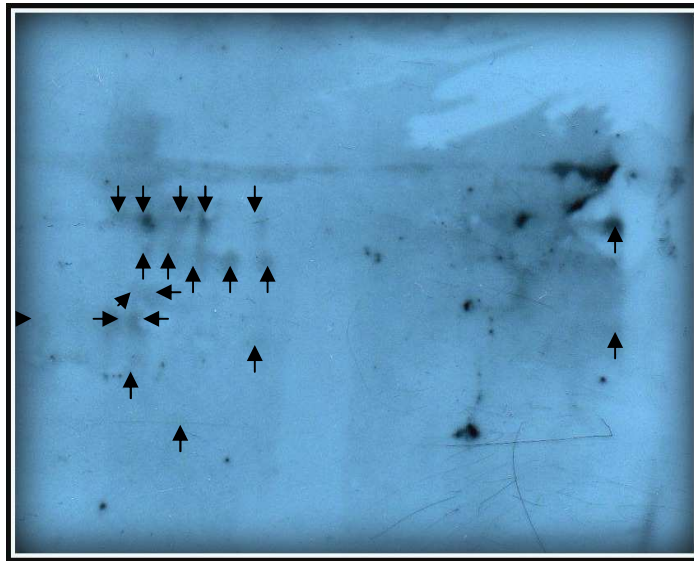


Figura 8. Inmunorreconocimiento de la mezcla de sueros de individuos UBT con las proteínas de *H. pylori* 43504 separadas 2DE.

CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones para analizar el perfil proteico de *H. pylori* ATCC 43504 en 2-DE.
- Se identificó que la región donde se encuentran principalmente las proteínas es entre un pI de 5.0 - 6.0 y una masa molecular de 21 - 116 kDa.
- No se encontró relación entre los pacientes positivos a la UBT y un alto título de anticuerpos anti- IgG contra *H. pylori*.
- Se encontró inmunorreconocimiento predominante en bandas proteicas de baja masa molecular por los sueros de individuos infectados.
- Se estimó el valor práctico de la masa molecular y punto isoelectrico obtenido, para las proteínas inmunogénicas.

RECOMENDACIONES

Es indispensable mejorar la calidad de los extractos proteicos que se analizarán por doble dimensión empleando suplementos libres de albúmina al momento de realizar los cultivos (como puede ser el uso ciclodextrinas) o implementando métodos de limpieza más eficientes.

Mejorar resolución de los geles separados 2DE-inmunodetección, empleando geles de isoelectroenfoque de mayor longitud y reduciendo los márgenes de pH.

Realizar análisis y agrupamiento en la selección de la población de estudio para conocer sus características patológicas y sociales, y poder asociarlas con un reconocimiento específico.

Obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas inmunogénicas, para poder caracterizarlas y establecer las posibles asociaciones.

Realizar análisis de diferentes cepas locales de *H. pylori* para identificar proteínas inmunogénicas conservadas en la región que pudieran emplearse como blanco para el desarrollo de métodos diagnóstico o con fines terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar G, Ayala G, Fierros G. 2001. *Helicobacter pylori* recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pública Mex.* 43:237-247.
- Anzures B. 2001. *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 64:199-200.
- Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell SD, Ottemann KM, Stein M, Salama RN, Guillemin K. 2009. The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. *J Bacteriol.* 191(1): 447-448.
- Barriga Angulo G, Arumir Escorza C, Mercado González F. 2004. La prueba de aliento en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Mex Patol Clin.* 51(4): 194-199.
- Base de datos de proteínas de *H. pylori* disponible: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/menu_frame.cgi?gel=
- Blaser MJ, Atherton JC. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 113: 321-333.
- Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Correa M, Ordóñez N. 2000. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. *Colombia Med.* 31(3): 122-130.
- Caballero Villaraso J, Márquez Calderón S, Villegas Portero R. Aplicaciones Clínicas de las técnicas proteómicas. 2006. Informes, estudios e investigación. Ministerio de sanidad y consumo. Madrid España. Agencia de evaluaciones de tecnologías Sanitarias de Andalucía.
- Carrascal E, Correa P, Ordóñez N, Bravo LE, Cortés A. 2000. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. *Colombia Médica.* Colombia 31(003): 22-130.

- Chomvarin C, Ottiwet O, Hahnvajanawong C, Intapan PM, Wongwajana S. 2009. Seroreactivity to specific antigens of *Helicobacter pylori* infection is associated with an increased risk of the dyspeptic gastrointestinal diseases. *International J Infec Dis*. 13: 647-654.
- Christopher LC, Harry LT. 1997. *Helicobacter pylori* protocol. *Methods in molecular medicine*.
- Corrales FJ, Santamaría E, Fernández Irigoyen J. 2006. Proteómica y aplicaciones en biomedicina. *Hematológica*. Edición española. 91(1): 42-47.
- Corti ER. 2009. *Helicobacter pylori*: algunos aspectos epidemiológicos en Latinoamérica luego de un cuarto de siglo. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 39: 175-176.
- Deankanob W, Chomvarin C, Hahnvajanawong C, Intapan PM, Wongwajana S, Mairiang P, Kularbkaew C, Sangchan A. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients and volunteer blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Health*. 37(5): 958-965.
- Díaz-Macias ME. 2009. Estado del arte sobre proteómica de la infección por *H. pylori* y enfermedades asociadas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado presentado para optar por el título de bacteriólogo. Bogota D.C.
- Dirk Bumann, Sevil Aksu, Meike Wendland, Katharina Janek, Uschi Zimny – Arndt, Nicolas Sabarth, Thomas F. Meyer, and Peter R. Jungblut. 2002. Proteome Analysis of Secreted Proteins of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 70(7): 3393-3403.
- Doig P, Trust TJ. 1994. Identification of surface – exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 62(10): 4526-4533.

- Dubreuil D, Giudice G, Rappuoli R. 2002. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66: 617-629.
- Dunn B, Cohen H, Blaser M. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* 10: 720-741.
- Echarri A, Borda F. 1998. Infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *ANALES.* 21: 45-53.
- Emel O. 2008. Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection. *Gulhane Tip Dergisi.* 50: 60-64.
- Farshad S, Alborzi A, Japoni A, Hayati M, Saberfirouzi M, Lankarani K, Taghavi A, Nasiri J, Rafatpour N, Irajian G. 2006. Immunodominant antigens of *Helicobacter pylori* strain isolated from patients with different gastroduodenal diseases. *Saudi Med.* 27(6): 794-798.
- Fuentes Pananá E, Carmorlinga Ponce M, Maldonado Bernal C. 2009. Infección, Inflamación y cáncer gástrico. *Salud Pública Méx.* 51(5): 427-433.
- González-Morales J, Leal-Villarreal L, Guzmán-López S, Guzmán-Treviño G, González-Martínez N. 2004. *Helicobacter pylori* y la enfermedad. *Rev Alergia Mex.* 51: 218-225.
- Gorg A. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. 2004. Handbook from GE Healthcare. Technical University of Munich, Germany.
- Hardin FJ, Wright RA. 2002. *Helicobacter pylori*: Review and Update. *Hospital Physician.* 23-31.
- Harris P, Venegas A. 2006. Vacunas en desarrollo: *Helicobacter pylori*. *Rev Chil Infect.* 23(3): 249-256.
- Israel DA, Peek RM. 2001. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori* – induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther.* 15: 1271-1290.

- James V. 2003. *Helicobacter pylori*. Pathology and Diagnostic Strategies. Am J Clin Pathol. 119: 403-412.
- Jeong-Won P, Seung-Gyu L, Jae-Young S, Jin-Su J, Jung-Soo J, Hee-Shang Y, Ji-Hyun S, Hyung-Lyun K, Seung-Chul B, Woo-Kon L, Myung-Je C, Kwang-Ho R. 2007. Proteomic Analysis of *Helicobacter pylori* Whole Cell Proteins using the narrow range IPG Strips. J Bacteriol Virol. 37(4): 203-212.
- Johannes G, Arnoud H. M. van Vliet, Ernest J. Kuipers. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Microbiol Rev. 19(3): 449-490.
- Jungblut PR, Bumann D, Haas G, Zimny-Arndt U, Larner S, Siejak F, Aebischer A, Meyer TF. 2000. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 36(3): 710-725.
- Kanishtha A, Shvetank A. 2008, *Helicobacter pylori* Vaccine: From Past to Future. Mayo Clin Proc, 83(2): 169-175.
- Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. 2000. Identification of Immunodominant Antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of Their Reactivities with Sera from Patients with Different Gastroduodenal Pathologies. Infect Immun. 68: 915-920.
- Laheij R, Straatman H, Jansen J, Verbeek A. 1998. Evaluation of Commercially Available *Helicobacter pylori* Serology Kits: a Review. J Clin Microbiol. 36(10): 2803-2809.
- Leal H, Torres J, Perez P, Gomez A, Monath T, Tapia C, Muñoz O. 1999. Serologic IgG response to ureasa in *Helicobacter pylori* infected persons from México. Am J Trop Med Hyg. 60(4): 587-592.
- Lin YF, Wu MS, Chang CC, Lin SW, Lin JT, Sun YJ, Chen DS, Chow LP. 2006. Comparative Immunoproteomics of identification and characterization of virulence factors from *Helicobacter pylori* related to Gastric Cancer. Mol Cell Proteomics. 5(8): 1484-1496.

- Lock RA, Coombs GW, McWilliams TM, Pearman JW, Grubb WB, Melrose GJ, Forbes GM. 2002. Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 7(3): 175-182.
- Marais A, Mendz G, Hazell S, Megraud F. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63: 642-674.
- Marshall B. 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med JRCPL*. 2: 147-152.
- McAtee P, Moon Young L, Fung K, Velligan M, Fry K, Chow T, Berg D. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis and serum profiling. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5(4): 537-542.
- Ming-Hong C, Ming-Shiang W, Jou-Town L, Shyh-Horng C. 2005. Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics*. 5: 3895-3901.
- Montecucco C, Papini E, Bernard M, Zoratti M. 1999. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Letters*. 452: 16-21.
- Penta R, De Falco M, Iaquinto G, De Luca A. 2005. *Helicobacter pylori* and Gastric Cells: from Gastritis to Cancer, *J Exp Clin Cancer Res*. 24(3): 337-345.
- Piñol F, Paniagua M. 1999. Mediadores bacterianos de la inflamación en la gastritis crónica por *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Med*. 38: 276-283.
- Portal-Celhay C, Perez-Perez G. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical Science*. 110: 305-314.
- Rascón-Durán L. 2008. Caracterización Bioquímica de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir una respuesta

- inmune humoral en un modelo murino. Tesis Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora.
- Rodríguez-Hernández IC. 2007. Evaluación de la presencia de anticuerpos (IgG) contra *Helicobacter pylori* en pacientes del hospital general del estado de Sonora mediante ELISA y dos sistemas comerciales. Tesis Especialización en Inmunohematología Diagnóstica. Universidad de Sonora.
- Ruiz-Bustos E, Ochoa JL, Wadstrom T, Ascencio F. 2001. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. J Med Microbiol. 50: 215-222.
- Sachs G, Weeks D, Melchers K, Scott D. 2003. The Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. Annu Rev Physiol. 65: 349-69.
- Segura Cabrera A. 2009. Predicción y análisis computacional de nuevas interacciones entre proteínas que participan en la patogénesis de *Helicobacter pylori*. Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa Tamaulipas México.
- Serrano A, Hernández C, De la Garza S, Herrera L. 2009. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. Cancerología 4: 193-204.
- She R, Wilson A, Litwin M. 2009. Evaluation of *Helicobacter pylori* Immunoglobulin G(IgG), IgA, and IgM serologic testing compared to stool antigen testing. Clin Vaccine Immunol. 16(8): 1253-1255.
- Szczepanik M. 2006. Interplay between *Helicobacter pylori* and the immune system: Clinical Implications. J Physiol Pharmacol. 57(Supl 3): 15-27.
- Thomas R, Correia de Sousa J. 2006. Screening for *Helicobacter pylori*. Rev Port Clin Geral 22: 585-589.

- Torres J, Leal Y, Perez G, Gómez A, Carmolina M, Rivera R, Tapia R, Onofre M. 1998. A community based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis. 178(4): 1089-94.
- Torres J, Lopez L, Lazcano E. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. Cancer epidemiol biomarkers prev. 14: 1874-1877.
- Vega A, Cortiñas T, Mattana C, Silva H, Puig de Centorbi O. 2003. Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with Cyanobacterial extract. J clin Microbiol. 41(12): 5384-5388.
- Zevering Y, Jacob L, Meyer TF. 1999. Naturally acquired human responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. Gut 45: 465-474.

ANEXO 1

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas son las macromoléculas más grandes y de más amplia distribución en la célula. Sus propiedades biológicas, así como muchas de sus propiedades físicas y químicas dependen de la integridad de sus estructuras, lo que influye directamente en su funcionalidad, en base a la cual, se pueden clasificar en: enzimas, proteínas estructurales, motoras, reguladoras, transportadoras, hormonas, receptores proteicos, de defensa y de almacenaje. Dada la importancia de los papeles que pueden desempeñar las proteínas en los sistemas biológicos, su análisis se ha vuelto imprescindible y para esto se han desarrollado diversas técnicas que facilitan su estudio.

Una las técnicas habitualmente utilizadas en el análisis de proteínas, es la electroforesis, que se puede realizar en diferentes modalidades y condiciones, los cuales dependerán del interés de estudio. En este caso se utilizó un sistema discontinuo (conformado por dos geles de poliacrilamida: uno de resolución y otro de empacamiento que presentan diferente concentración, composición y pH). El gel de empacamiento generalmente se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositan las muestras. El gel de resolución por su parte forma el cuerpo del gel por donde migran y se separan las proteínas. Las muestras proteicas se trabajaron bajo condiciones desnaturalizantes, empleando un detergente (SDS =dodecil sulfato sódico), que actúa desplegando las proteínas y cargándolas negativamente, esta muestra se coloca en uno de los pocillos del gel y se aplica un potencial eléctrico que lo atraviesa, por lo tanto las moléculas migrarán a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, cuando los polipéptidos más pequeños se acercan a la base del gel, el proceso termina, y se sigue un procedimiento de tinción donde un colorante se une a los polipéptidos para hacerlo visibles y poder así

evaluar y establecer el patrón de separación proteica que finalmente podrá ser analizado e interpretado.

Soluciones para SDS-PAGE

Buffer I: **Separador pH 6.8** (*Trizma base 0.5 M/SDS al 0.4%*).

Buffer II: **Concentrador pH 8.8** (*Trizma base 1.5 M/SDS al 0.4%*). Para la 2DE se aumentó la concentración de SDS al 4%.

Buffer III: **Corrida 5X** (Pesar 72g de glicina, 15.1g de trizma base y 5g de SDS; disolver y aforar a 1L, diluir 1X para realizar la corrida y ajustar el pH a 8.3). Para la 2DE se aumentó la concentración de SDS.

Buffer IV: **Muestra 2X** (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, glycerol 20%, 2-mercaptoetanol).

Procedimiento para SDS-PAGE

1.- Preparación del Gel separador/Concentrador

Armar el equipo

Limpiar perfectamente los vidrios formadores del gel. Ensamblarlos en el equipo formador de geles utilizando los separadores correspondientes. Revisar que no existan fugas colocando agua con un transfer, descartar el líquido y secar.

Preparación del gel separador

Tomar los volúmenes correspondientes a la tabla 1 y agregarlos en un vaso precipitado de 50 mL, mezclar y adicionar lentamente entre los vidrios el líquido con ayuda de un transfer, evitando la formación de burbujas (2/3 del total del

vidrio). Posteriormente agregar alcohol etílico al 50% para permitir la polimerización. Esperar hasta que se distinga la interfase entre el gel y el alcohol (20-40 min) y luego esperar 10-15 min para terminar la polimerización.

Preparación del gel concentrador

Retirar el exceso de alcohol sobre el gel separador, secar con papel filtro. Tomar los volúmenes correspondientes a la tabla 1 y agregarlos en un vaso precipitado de 50 mL, mezclar y adicionar el líquido lentamente (evitar la formación de burbujas) sobre el gel separador ya polimerizado, acoplar el peine formador de pozos. Esperar hasta que se distinga la interfase entre los geles (20-30 min) y hasta que se termine la polimerización (10-15 min).

2.- Preparación de la muestra

Mezclar 15 μ L del buffer muestra 2X con 15 μ L de su muestra y agitar en vórtex, calentar a 95°C durante 5 min, pasado este lapso, introducir inmediatamente los microtubos en el congelador e incubar durante 1 min. Centrifugar a 2000 rpm por 1 min.

3.- Corrida electroforética

Una vez que esté listo el gel, se desmonta del equipo formador de geles y se monta en la cámara de corrimiento. Verificar que no existan fugas. Llenar 1/3 de la cámara y la parte interna entre los vidrios con buffer corrida y agregar 25 μ L de la muestra que desea analizar en cada pozo del gel. Conectar a la fuente de poder y aplicar corriente constante (90-100 Volts) hasta que el frente del gel llegue a medio centímetro del borde inferior de los vidrios.

4.- Tinción

Desmontar cuidadosamente el gel, y seguir el protocolo establecido para la tinción con AgNO_3 .

5.- Secado

Adicionar glicerol en la solución preservadora (1 mL/10 mL), agitar mínimo durante 1 hora. Escurrir el gel, colocarlo sobre un soporte plano y rígido (vidrio) y envolverlo cuidadosamente en papel celofán dulce, retirar el excedente de líquido, aire o burbujas, estirarlo perfectamente con ayuda de ganchos. Esperar 2-3 días hasta su secado.

Tabla I. Las cantidades que se describen a continuación están estimadas para un mini gel de 1mm de espesor con una concentración del 10 y 12%.

Reactivo	Gel separador		Gel concentrador (μL)
	12%	10%	
Acrilamida/Bisacrilamida (30%/0.8%) (mL)	2.7	2.21	433
Buffer I (pH 6.8) (mL)	-0-		833
Buffer II (pH 8.8) (mL)	1.7	1.66	-0-
H_2O (mL)	2.3	2.77	2000
Persulfato de amonio 10% (μL)	25	20	20
TEMED (μL)	5	4.6	5

ANEXO 2

TINCION CON SALES DE PLATA

Para poder visualizar la proteínas separadas mediante electroforesis (SDS-PAGE) es necesario emplear métodos de tinción con colorantes orgánicos o bien transferir el gel a una matriz para que se unan con anticuerpos específicos en alguna proteína de interés.

El colorante orgánico más utilizado es el Azul de Coomassie Brillante que nos permite detectar alrededor de 50 ng de proteínas por banda, pero cuando se desea obtener mayor sensibilidad se utiliza la tinción con sales de plata, con la que podemos analizar desde 0.3 hasta 10 ng de proteína por banda o mancha.

Esta tinción (sales de plata) fue introducida originalmente por Switzer en 1979, pero a través del tiempo ha tenido diversas modificaciones, encontrando actualmente una gran variedad de protocolos que nos permiten realizarla, pero de manera general estos protocolos se clasifican en dos: la tinción con **plata amoniacal** o también conocida como tinción alcalina y la tinción ácida donde se utiliza **nitrato de plata**. Cada protocolo tiene diferentes ventajas dependiendo del tiempo, sensibilidad, costo y compatibilidad con otros métodos analíticos, especialmente la espectrometría de masas (uso de glutaraldehído o formaldehído). Pero los mecanismos precisos de estas tinciones se basan en la unión *de los iones de plata* a las cadenas laterales de los aminoácidos (principalmente grupos carboxilo), que en condiciones adecuadas se *reducen a plata metálica*, lo que permite visualizar las proteínas fijadas al gel como bandas o manchas de color marrón.

En este caso utilizamos la tinción con Nitrato de plata siguiendo una metodología básica que se desglosa en varias fases; la primera consiste en la **fijación** donde las proteínas son inmovilizadas en el gel y se remueven los

compuestos que podrían causar alguna interferencia en la 2DE (glicina, tris, SDS, y anfolitos acarreadores). La segunda fase corresponde a la **sensibilización** que se usa para incrementar la formación de la imagen, para lo cual se han propuesto numerosos compuestos que se unen a proteínas, y estos se unen a los iones plata para reducirlos a plata metálica o producir sulfato de plata. Otra fase muy importante es la **impregnación** con plata, seguida de la fase de **revelado** de la imagen y finalmente se utiliza una solución “stop” para **estabilizar** la imagen.

RECOMENDACIONES

- Reducir al mínimo la manipulación del gel y usar guantes libres de talco por que puede contaminarse con Keratina de la piel.
- Los volúmenes de las soluciones deben ser suficientes para cubrir por completo el gel y nunca debe secarse.
- Cuando use TCA (9:9:2; alcohol-Ac. Acético-agua) deberá lavar el gel después de la fijación para remover ácido.
- El uso de agentes reductores como el glutaraldehido previo a la tinción plata incrementa la sensibilidad y velocidad de reducción de las proteínas.
- El uso de agua MiliQ aumenta sensibilidad y disminuye fondo.
- El uso de Tiosulfato de sodio, Carbonato y formaldehido puede reducir el fondo.
- Enfriar a 4°C la solución plata previo a su utilización puede aumentar la sensibilidad.
- La solución con carbonato debe prepararse al instante, dura estable alrededor de 10 min.
 - La solución reductora de Farmer, es estable por 30 min aproximadamente.

Preparación de Soluciones para Tinción con AgNO₃

Solución Fijadora (*Metanol 50%, Acido acético glacial 12%, Formaldehido 37% 25 µL/50 mL*): Para un gel de 1-1.5 mm preparar un volumen final de 25 mL (lo necesario para que cubra por completo el gel); agregando 10 mL de etanol, 2.5 mL de Ac. Acético y aforar hasta 25 mL con agua MiliQ, al momento de utilizarla agregar 12.5 µL de formaldehído.

Solución Sensibilizadora (*Etanol abs. 30%, Acetato de sodio an. 6.8%, Tiosulfato de sodio 0.2%, Glutaraldehido 25%, 500 µL/100 mL*): Para 25 mL agregar 7.5 mL de etanol, 1.7 gr de acetato de sodio anhidro, 0.05 gr de tiosulfato de sodio y 125 µL de glutaraldehído.

Solución Plata (*Nitrato de plata 0.25%, Formaldehido 37%, 40 µL/100 mL*): Pesar 0.0625 gr de nitrato de plata y disolver en 25 mL de agua MiliQ, añadir 15 µL de formaldehído al momento de usarse. Cubrirse de la luz.

Solución Reveladora (*Carbonato de sodio anhidro 2.5%, Formaldehido 37%, 20 µL/100 mL*): Pesar 0.625 gr de carbonato de sodio y disolver en 25 mL de agua MiliQ. Añadir 5 µL de formaldehído al momento de revelar. Esta solución tiene una estabilidad de 10 min, aprox. Agregar 1 cristal de tiosulfato de sodio para aumentar la sensibilidad.

Solución Stop (*NaEDTA 1.5%*): Pesar 0.375 gr de NaEDTA y disolver en 25 mL de agua MiliQ.

Solución Preservadora (*Etanol Absoluto 30%, Glicerol 4%*): Agregar 7.5 mL de etanol, 1 mL de glicerol y aforar hasta 25 mL con agua MiliQ.

Solución de Lavados: Se recomienda utilizar Etanol 20 - 50% (para evitar que se hinche el gel).

Procedimiento para la Tinción con AgNO₃

Una vez finalizada la SDS-PAGE, retirar el gel de los vidrios y colocarlo en un recipiente que le permita permanecer extendido, se pueden realizar 2-3 enjuagues con la solución de lavado y posteriormente adicionar cada una de la soluciones como se indica a continuación:

1.- Solución fijadora: Agregar el formaldehído a la solución fijadora, homogenizar y cubrir completamente gel. Incubar en agitación constante al menos 30 min. Es recomendable dejarlo toda la noche.

2.- LAVADOS: Realizar 3 lavados rápidos con etanol al 50%.

3.- Solución Sensibilizadora: Se agrega el glutaraldehido a la solución sensibilizadora y se cubre el gel durante 30 minutos.

4.- LAVADOS: Se realizan 3 lavados con etanol al 20%, 10 minutos cada uno.

5.- IMPREGNADO CON AgNO₃: Se agrega el formaldehido a la solución de nitrato de plata y se cubre el gel durante 20-30 minutos (dependiendo del grosor del gel), protegiendo en todo momento de la luz.

6.- LAVADOS: Realizar dos lavados rápidos con etanol al 20%, de 20 seg c/u para quitar exceso de la solución anterior.

7.- Solución Reveladora: Se agrega el formaldehído a la solución de revelado y se cubre el gel. Se debe dejar el tiempo suficiente para que aparezcan bandas de 3-10 min una vez que aparecen con la intensidad deseada retirar de inmediato para evitar fondo.

8.- LAVADOS: Realizar un lavado rápido (20 seg) con etanol al 20% para quitar el exceso de la solución anterior.

9.- Solución STOP: Se cubre el gel con esta solución durante 10 min con agitación constante (se puede usar la solución fijadora 1).

10.- LAVADOS: Se hacen 3 lavados con etanol 50% de 1 min c/u.

11.- Solución de Almacenamiento: Para secar el gel se cubre con esta solución al menos 30 min. Se puede dejar largos periodos.

ANEXO 3

DESTINCION CON FERROCIANURO DE POTASIO

El complejo de iones plata-proteínas del gel es subsecuentemente reducido a metal plata con formaldehído en ambiente alcalino con carbonato de sodio o hidróxido de sodio. El nitrato de plata libre puede ser removido lavando el gel antes de revelar para quitar el exceso. La distinción parcial de los geles usando el agente reductor de Farmers es recomendado para remover el background teñido que obscurece el gel e interfiere con la interpretación de los patrones de proteínas.

SOLUCION REDUCTORA DE FARMER (Ferrocianuro de Potasio/ Tiosulfato de Sodio): Se prepara ferrocianuro de potasio 30 mM y tiosulfato de sodio 100 mM. Mezclar ambas soluciones en volúmenes iguales, el resultado será una solución amarillenta estable por 30 minutos.

Procedimiento: Es necesario remover la solución stop del gel previamente teñido y realizar un lavado con agua durante 5 minutos en agitación. Posteriormente colocarla la solución reductora de Farmers e incubar en agitación entre 5-15 minutos (estable por 30 min) dependiendo de la intensidad del background. Terminar la distinción regresando el gel a la solución stop.

ANEXO 4

ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN (2DE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una técnica indispensable en el análisis y estudio de las proteínas. Existen diferentes modalidades y su aplicación dependerá del interés del estudio que se esté realizando. Sin lugar a duda cada día se requiere del análisis de muestras más complejas, lo que exige el uso de métodos más potentes que permitan ofrecer mayor capacidad de separación. Para lo cual, se ha venido empleado la electroforesis bidimensional (2DE), que involucra la combinación de dos métodos individuales de alta resolución donde generalmente como primera dimensión se utiliza el isoelectroenfoque que separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI) seguido de la SDS-PAGE que separa las proteínas en base a su masa relativa (Mr), estos métodos individualmente tienen la capacidad de separar alrededor de 100 proteínas, pero cuando son combinados pueden separar más de 1500.

Los protocolos a seguir cuando se utiliza 2DE son muy variados, y para poder determinarlos se deberá considerar el tipo de muestra y el interés del estudio. Además, deberá considerarse la gran diversidad de tipos y orígenes de proteínas (las podemos encontrar en complejas membranas, ácidos nucleicos u otras proteínas de agregados no específicos). Idealmente los procesos deben permitir la completa solubilización, disgregación, desnaturalización y reducción de las proteínas, siempre buscando seguir la estrategia simple posible para minimizar las pérdidas de proteínas durante el proceso, que básicamente consta de 4 etapas: la rehidratación de la muestra, el isoelectroenfoque (IEF), el equilibrio de las tiras y la SDS-PAGE. También como un proceso opcional se pueden aplicar tratamientos previos a la muestra, para eliminar posibles interferencias (sales, ácidos nucleicos, detergente o lípidos), uno de estos es la precipitación de proteínas con acetona o bien existen casas comerciales

que ofrecen productos específicos para eliminar o reducir cada posible contaminante.

En la rehidratación, la muestra debe ser resuspendida en una solución que permita que las proteínas se mantengan completamente solubilizadas, desnaturalizadas, disgregadas y reducidas. En esta etapa, se permite que las proteínas entren en la tira del gel, ya sea de forma activa o pasiva, lo cual dependerá de la aplicación o no de electricidad. Como agente desnaturizante se utiliza la Urea 8 M, que además permite solubilizar las proteínas. La completa desnaturalización asegura que cada proteína está presente en solo una configuración y evita la agregación o interacción. El detergente CHAPS 2-4% permite la solubilización y agregación mediante interacciones hidrofóbicas. Como agente reductor se puede utilizar DTT 20-10 mM, el cual abre y une los puentes disulfuro presentes y mantiene a las proteínas en estado reducido. Como agentes solubilizantes se utilizan acarreadores o anfólitos (IPGs), que permiten unión a proteínas y facilitan su solubilización, minimizando la agregación con sus interacciones carga-carga.

En el isoelectroenfoque se recomienda un incremento gradual en el voltaje aplicado, iniciando con valores bajos por varias horas para minimizar agregación y permitir la separación paralela de diferentes muestras con diferentes concentraciones de sales, sobre todo cuando se aplica más de 100 µg de proteína por tira.

En el paso de equilibrio el Tris-HCl mantiene las IPGs en un rango de pH apropiado. La Urea 6 M junto con el glicerol reduce efectos de endosmosis debido a la mezcla de cargas que pudieran interferir en la transferencia a la 2DE. El DTT preserva las proteínas reducidas y desnaturalizadas. La iodoacetamida alquila los grupos tiol de proteínas previniendo oxidación. Finalmente se satura la tira del gel con SDS para culminar con la SDS-PAGE donde se separan todas las bandas que fueron separadas en el IEF.

Soluciones para 2DE

Buffer de Rehidratación (7 M Urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 50 Mm DTT, 0.2% Bio-Lyte 5/8 ampholyte, 0.002% Azul Bromofenol).

Solución de Equilibrio I (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, TRIS-HCl 0.375 M, DTT 2%).

Solución de Equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, TRIS-HCl 0.375 M, Iodacetamida 2.5%).

ANEXO 4

Precipitación de Proteínas con Acetona Fría

1. Se agregaron 400 μL de acetona fría en un microtubo y se añadieron 100 μL del extracto proteico de Hp43504 (200 μg de proteína estimado según el micrométodo Bradford). La concentración final de la acetona será al 80% considerando que se agregó una parte de la muestra por cada 4 partes de acetona al 100%.
2. Se agitó en vórtex hasta disolver por completo (5-10 min).
3. Se incubó a -20°C por 60 minutos.
4. Se centrifugó 10 minutos entre 13 000 – 15 000 xg a 2°C .
5. Decantar el exceso de acetona cuidando que no se disgregue el precipitado. El procedimiento anterior se repite entre 2-5 veces hasta remover completamente la interferencia.
6. Decantar la acetona y evaporar el sobrante a temperatura ambiente en la campana de extracción, cuidando no sobresecar la muestra.
7. Resuspender el pellet en la solución adecuada (buffer rehidratación).

ANEXO 5

Micrométodo de Bradford (SIGMA)

El reactivo de Bradford (RB) puede ser utilizado para determinar la concentración de proteínas en solución. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre la unión del Brilliant Blue G y las proteínas de solución, lo que genera un cambio en la absorbancia dentro de un rango de 465 a 595 nm. La cantidad de luz que es absorbida es proporcional a la concentración de proteínas presentes. Se puede utilizar el micrométodo empleando placas de 96 pozos. El rango de concentración lineal de proteínas es de 0.1-1.4 mg/mL, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. El ensayo consiste en mezclar una parte de proteínas con 30 partes del RB, se realiza a temperatura ambiente y el cambio de color inicia inmediatamente.

Procedimiento

- 1.- Preparar una curva estándar de proteína empleando un rango 0.1-1.4 mg/mL de BSA.
- 2.- Agregar 250 μ L del RB en cada pozo, cuidando de la luz y temperatura.
- 3.- Agregar 5 μ L de cada estándar de proteína en cada pozo, así como de muestra y blanco (buffer empleado para disolver BSA).
- 4.- Mezclar en un shaker aproximadamente 30 segundos.
- 5.- Incubar a temperatura ambiente 5-45 minutos. Medir absorbancia a 595 nm en un tiempo no mayor a 60 minutos.
- 6.- Graficar absorbancia contra concentración de cada estándar. Determinar la concentración de proteína de la muestra comparando el valor de la absorbancia de la curva estándar.

ANEXO 6

ReadyPrep 2D-Clenaup Kit

BioRad

Este kit comercial facilita la preparación de muestras con baja conductividad para su uso en IEF y 2DE. Además concentra la proteína de muestras diluidas permitiendo aumentar la señal para la detección de spots.

Procedimiento

- 1.- Transferir de 1-500 µg de proteína en un volumen final de 100 µL a un microtubo de 1.5 mL.
- 2.- Adicionar 300 µL del agente precipitante 1 a la muestra de proteína y mezclar muy bien en vórtex. Incubar en hielo por 15 minutos.
- 3.- Adicionar 300 µL del agente precipitante 2 a la mezcla de proteína y agente precipitante 1. Mezclar muy bien en vórtex.
- 4.- Centrifugar los tubos a velocidad máxima (12000 xg) por 5 minutos para formar el pellet y descartar sobrenadante.
- 5.- Centrifugar 30 segundos a 15 000 xg en la misma posición que el paso anterior y eliminar todo el líquido posible.
- 6.- Adicionar 40 µL del reactivo de lavado 1 sobre el pellet. Centrifugar en las condiciones anteriores.
- 7.- Descartar la solución de lavado.
- 8.- Agregar 25 µL de ReadyPrep proteomic grade water y agitar en vórtex 10-20 segundos.
- 9.- Agregar 1 mL de wash reagent 2 (precongelado a -20°C al menos una hora previa)

- 10.- Incubar el tubo a -20°C por 30 minutos agitando en vórtex 30 segundos cada 10 minutos.
- 11.- Después del periodo de incubación centrifugar a 15000 xg por 5 minutos para formar el pellet. Descartar el sobrenadante. Centrifugar 30 segundos de nuevo, descartar el líquido y dejar secar al aire no más de 5 minutos.
- 12.- Resuspender cada pellet adicionando el volumen adecuado de buffer muestra. Agitar en vórtex 30 segundos. Incubar a temperatura ambiente 3-5 minutos y volver con agitación en vórtex 1-2 minutos.
- 13.- Centrifugar a velocidad máxima 2-5 minutos a temperatura ambiente. Usar el sobrenadante para rehidratar la tira. Se puede almacenar la muestra a -80°C para análisis posteriores.